BioRadiations

A Resource for Life Science Research Number 006

GEARING UP FOR PROTEIN PRODUCTION

In this issue:

in this issue:

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
ライフサイエンス事業本部

本社
〒116-0014 東京都荒川区東日暮里5-7-18
TEL.03-5811-6270

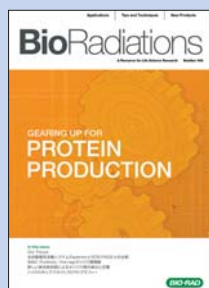
大阪営業所
〒532-0025 大阪市淀川区新北野1-14-11
TEL.06-6308-6568

福岡営業所
〒812-0013 福岡市博多区博多駅東2-18-30
TEL.092-475-4856

製品のお問い合わせ
バイオ・ラッドはお客様の問題点や製品の学術についてのお問い合わせに対応いたします。下記の番号または最寄りの営業所にお問い合わせください。

ライフサイエンス事業本部　テックサポート(学術)
TEL.03-5811-6271
FAX.03-5811-6272

ライフサイエンス事業本部　技術サービス
TEL.03-5811-6626／06-6300-5901
FAX.03-5811-7475／06-6308-3064

On the Cover :
Conceptual illustration by
Chris Crutchfield

BioRadiations magagine is published by
Bio-Rad Laboratories, Inc.
2000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547 USA

Our Focus

What's New

Product Focus

Cover Story

Bridge

Technical Reports

Miscellanea

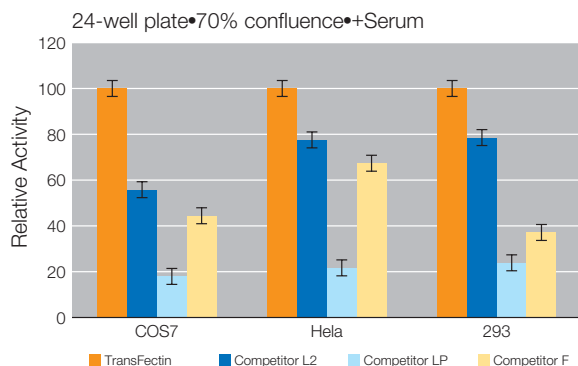
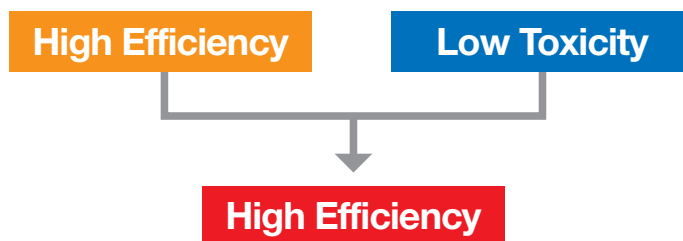
Feedback

Concept 1

遺伝子発現 ―Gene Expression―

より効果的な遺伝子導入のために

理想的なリポフェクション試薬とは？

遺伝子導入で最も多くの方に用いられている手法のひとつであるリポフェクションは、特別な装置を必要としないため、ほ乳動物細胞への導入法としてまず最初に検討されています。リポフェクションでは、高い導入効率（High Efficiency）かつ低い細胞毒性（Low Toxicity）の条件で導入を行い、導入後の細胞が高い発現活性（High Activity）の状態であることが理想的です。バイオ・ラッドのリポフェクション試薬であるTransFectin Lipid Reagentは独自のカチオン性脂質により、両立が困難であった高い導入効率と低い細胞毒性を兼ね備えた、ベクターの導入に最適な試薬です。

TransFectin（橙色）および市販の試薬によるトランスフェクションを行った細胞における*β*-ガラクトシダーゼの発現。

siRNAにはsiRNAに特化した試薬を

最近ではsiRNAによるジーンサイレンシングが遺伝子発現解析研究における重要なツールとなってきています。ジーンサイレンシングでは、特に低い細胞毒性がリポフェクションを評価する時の重要なファクターです。細胞毒性が高い場合、発現量の幅が狭くなってしまうことでより正確な発現抑制効果の測定が難しくなってしまいます。バイオ・ラッドのsiLentFect Lipid ReagentはsiRNAの導入に特化したリポフェクション試薬です。siRNAとのアフィニティが高く、かつ細胞毒性を抑えた試薬ですので、siRNAを用いたジーンサイレンシング実験に適しています。

siLentFectは幅広い細胞種で利用可能で、導入が難しい細胞に対しても有効です。上皮細胞でのタイトジャンクションの研究によく用いられるCaco-2細胞は導入が比較的困難な細胞系ですが、シカゴ大学の研究室ではsiLentFectを用いてsiRNAを導入し、MLCK1遺伝子の発現抑制に成功しました。詳細は弊社ブレティンTech Note 5370に記載されております。

リポフェクションで導入困難な時は？

リポフェクションでは導入が困難な細胞に対しては、エレクトロポレーションを用いる必要があるかもしれません。またエレクトロポレーションによるsiRNAの導入例も最近増えてきていますsiRNAを弊社のジーンパルサーで導入した文献例は、弊社ブレティンTech Note 5399にてリスト化しております。

上記で紹介しましたブレティンは、いずれも弊社Webサイト（http://discover.bio-rad.co.jp）からダウンロードすることが可能です。
またTransFectinとsiLentFectの文献リスト（Tech Note 5343）もダウンロードすることができます。

Special Interview

筑波大学
大学院人間総合科学研究科
三輪 佳宏 先生

現在のご研究テーマについて

蛍光タンパク質を用いたイメージングにおける、生体にも利用可能な新規プローブの開発がメインテーマである。最近開発したものとして、細胞内でのユビキタスな分解制御を利用したデグラトンプローブがある。これは薬物などの低分子の有無をモニタリングできるもので、現在分解制御システムのメカニズム解明を含めて、プローブの開発を進めている。

遺伝子導入実験での重要ポイントについて

導入された細胞で確実に発現されるようなベクターシステムが必要であると考えている。メーカーからのキットをそのまま使用するのではなく、ある程度自分の研究対象での条件検討することも重要ではないかと思う。

遺伝子導入の手法として現在どのような手法を用いられていますか?

リピッド系の試薬であるTransFectinを用いている。以前、エレクトロポレーションを用いていたが、今行なっている研究のようにどうしても100～200種類のサンプルを一度に処理しなければならない場合にはリピッド系の試薬が便利である。新製品が出ると比較検討を行なっているが、TransFectinは他社と比べて導入効率が高いので使い続けている。

導入後の確認する手法としては?

我々の研究の目的が蛍光タンパク質なので、ほとんどフローサイトメトリーで最終的な確認を行なっている。RNAレベルでの確認ではRT-PCRを用いている。

遺伝子導入手法の今後について

細胞膜の薬物透過性の解明にも興味を持っているが、リピッド系試薬でも透過性のメカニズムがより解明されると、よりよい製品が開発されていくのではないだろうか。ある分子の膜透過性を研究するために、有機合成分野の先生と共同研究している。バイオと他分野との境界領域には課題が数多く残されていると思う。他分野との交流と融合を進めていくことで面白い研究テーマや製品が出てくるかもしれない。

発現ベクターを開発していると、「遺伝子発現」に関するあらゆる仕組みを知る必要があるように、ただツールを使うだけではなく、ツールの元となっている自然界の仕組みに目を向けてみると、そこに新しい世界が開けることがあるのではないか。

バイオ・ラッドに期待すること

バイオ・ラッドは機器・試薬ともに総合的に扱っているメーカーとして、それぞれを組み合わせた強みのある製品の提供に期待したい。

User's Voice

TransFectin

F9細胞については、驚きで他の研究者には教えたくないほどの結果が得られています。もともとそれほどトランスフェクション効率がよくないのですが、TransFectinでは50%は入るようです。（医科大学 H様）

ラットのprimary cultured cortical neuronに対して、今まで使用していた試薬と比べて同等の導入効率でしたが、細胞毒性は低い結果が得られました。

（東京都 研究所 U様）

siLentFect

前立腺癌の細胞では他社と比べて大きな差はありませんでしたが、腎癌細胞への導入効率が高く、また毒性も低いので非常にいいです。継続して使用しています。（製薬企業 研究所 T様）

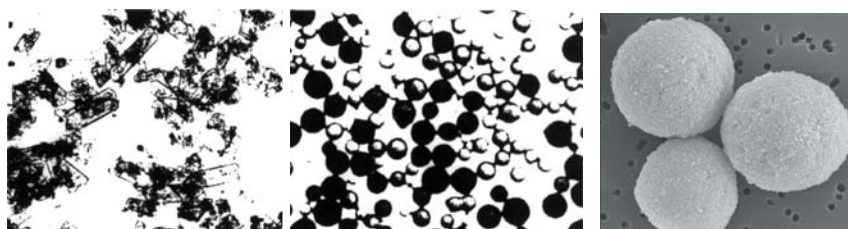
Concept 2

タンパク質分離 −Protein Separation−

バイオ・ラッドでは「ハイドロキシアパタイトは扱いやすい」「再現性が良い」が常識です。
セラミックハイドロキシアパタイト（CHT）がタンパク質精製の効率を変えるかも知れません。

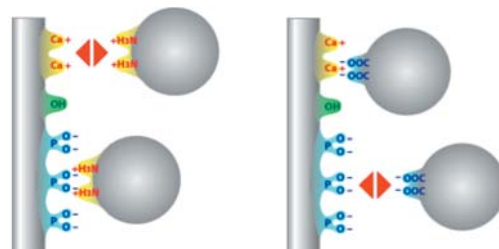
セラミックハイドロキシアパタイト担体の可能性を知っていただくために、その基本を改めてご紹介いたします。
※「第3回 CHTセラミックハイドロキシアパタイト シンポジウム」についてはP42で紹介しています。

セラミック化することで高流速・高耐圧性を実現！

従来の針状結晶のハイドロキシアパタイトを球状化、加熱焼成することでセラミック化したのがセラミックハイドロキシアパタイト（CHT）。（右図）物理的強度が上がったCHT粒子は粒径が整い、崩れ難くなっており、高流速・高耐圧性を実現しました。

針状結晶　セラミックタイプ

＜針状タイプとセラミックタイプとの構造の違い＞

分離の原理は意外とシンプル

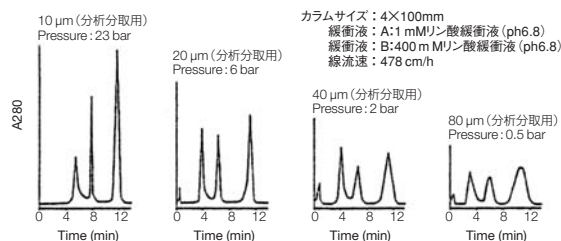
その分離機構は難しい、と思われがちなアパタイト担体ですが、基本は陽イオン交換とCa^{2+}へのキレート効果の2つを考慮すればよいのです。タンパク質のアミノ基は担体表面のリン酸基　PO_4^{2-}と（陽イオン交換）、カルボキシシル基はカルシウムイオンと（キレート効果）、それぞれ作用します。ですからクロマトグラフィーの際は塩濃度とリン酸濃度のデュアルグラジェントが可能となります。

陽イオン交換クロマトグラファー
・タンパク質のアミノ基が作用
・NaCl等塩濃度を上げて溶出

キレート効果
・タンパク質のカルボキシシル基が単純なイオン結合と比較しておよそ15〜60倍強い
・塩濃度だけを上げても溶出されない
・PO_4^{2-}濃度を上げる、または低濃度PO_4^{2-}存在下塩濃度を上げて溶出

手段や目的に応じて選ぶ事ができます

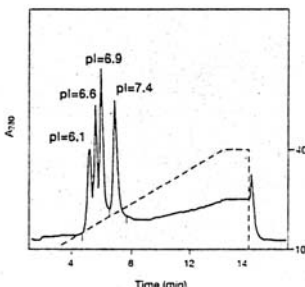
CHTは焼成時の温度によってType ⅠとType Ⅱの2種類があります。Type Ⅰはキレート効果が比較的強いため、酸性タンパク質が結合しやすい傾向があります。Type Ⅱはポアサイズが大きく、比較的分子量の大きなタンパク質やウイルスの分離に使用できます。
粒径も10、20、40、80 μmの4種類をご用意。分離したいターゲットや中・高圧or低圧クロマトグラフィーのどちらか、カラムのサイズ等々、目的や手段に応じてお選びいただく事ができます。判断に迷うようであれば一度お問合せください。

	Type Ⅰ	Type Ⅱ
ポアサイズ	600−800 Å	800 −1,000 Å
表面積	~40 m^2/g	~20 m^2/g
耐圧性	60 bar	100 bar
IgG結合容量	10−50 mg / ml	5−50 mb / ml

＜CHTのType ⅠとType Ⅱの違い＞

＜分離パターンに及ぼす粒子サイズの影響＞

こんなに高分離能

例えばモノクローナル抗体の分離。わずかな等電点や構造の違いでの分離も可能。他のタンパク質でも同様のことが起こります。既存の手法でうまく分離がいかない、というお客様は是非お試しください。

市販の抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体をセラミックハイドロキシアパタイトで分離した例を示します。
カラムサイズ：4×35 mm
抗体：Type Ⅰ、10 μm
緩衝液：リン酸ナトリウム緩衝液（ph6.8）
溶出方法：リニアグラジェント（10 mM−400 mM）

＜混合モノクローナル抗体の分離＞

＜等電点と溶出時間の関係＞

モノクローナル抗体	サブクラス	等電点	溶出時間（分）
A	IgG1	6.0	5.49
B	IgG2a	6.0	5.18
C	IgG2a	5.8	7.87
D	IgG2b	5.9	7.52

左記と同じ条件でやはり市販の抗ヒトβ2 microglobulinモノクローナル抗体を分析した結果を示します。
このモノクローナル抗体群は同じ抗原を認識していますが抗体のサブクラスが異なり、この場合には等電点と溶出時間の間には一定の傾向が見られません。
等電点以外の糖含有・構造の違いなどを認識している可能性があります。

研究室メンバーと客員教授Prof.Chen一家との集合写真。
中央筆者、右上（Prof.Chen）、左（Prof.Chenの娘さんと奥さん）

Special Interview

山口大学　工学部 応用化学工学科 バイオ・プロセス設計工学
山本 修一 先生

クロマトグラフィー愛 ～Chromatography－I love it!～

研究のはじめは・・

クロマトグラフィーの研究をはじめたのは（正確に言えば、はじめさせられた？）1970年代後半なので、もう30年近く関わっていることになる。
研究の初期では、モデル化ということが大きな目的であり、いかに実験結果を数値計算で表現できるのか、そのためのデータをどのように取得するかということに力を注いでいた（ような気がする）。
もちろん私にとってのクロマトグラフィー研究は分析ではなく、プロセス（分取）が目的である。
またパーソナルコンピュータもない時代なので、データはチャート紙を読みとり整理し、計算はパンチカードを持って大型計算機センターへでかけるという日常であった（ときどき、あの時間を返してくれと叫びたくなるのだが・・）。
プロセスクロマトグラフィーの（かなり主観な）近代史を、自分で作成して眺めてみると自分自身には予想がつかない発展があったことがわかる。大学院生当時は第一次バイオブームではあったものの、特にプロダクトがあったわけではなく、クロマトグラフィーで精製する製品としては酵素などを漠然と想像していたような気がする（今とは違い、特に学生にとって研究は研究であるという哲学が許されていた）。

英文の本を出版・・・

博士を修了して山口大学に勤務した直後にBiotechnolgy and Bioengineering誌に掲載された論文を読んだ出版社Marcel Dekkerの経営者の一人であるDr. Maurits Dekkerから本を書かないかという手紙が届いた。隔世の感があるが、まだ大学にはfaxもなく（e.mailやinternetは当然使用できるわけはなく）、航空便のやりとりで粒粒辛苦して1988年に「Ion Exchange Chromatography of Proteins」として無事出版された。

本への反響とバイオ医薬品の登場

しかしながら、この本が、どのような人に、どのような目的で読まれるかは深く考えておらず、やっと完成してほっとしていたという気分であった。しかし予想もしない状況が米国では起きていた。すなわちタンパク質バイオ医薬品の開発競争である。コロラド州ボールダー（日本では高橋尚子などマラソンランナーの練習場所として有名）にあったSynergenという会社（バイオベンチャー）では、上記の本を多数購入してみんなで勉強したあげく私のモデルを活用して15Lから370Lへタンパク質バイオ医薬品クロマトグラフィー精製プロセスをスケールアップすることに成功した。この報告（1992－1993年頃）はインパクトがあったようで（私はまったく関与していないのだが）、以後Yamamoto Modelはいろいろなところで利用されるようになった。
私自身、自分のモデルの利用方法を教えてもらったという奇妙な体験であった。
いずれにせよ、私のモデルそれ自身も意味があったのであろうが、それ以上に1グラム1億円という想像もできない価格のタンパク質バイオ医薬品というプロダクトと大きな市場ができたことにより、私のモデル化が意味を持つようになったということが実際であろう。

やっぱり愛？

ところでクロマトグラフィーでノーベル賞を受賞したMartinは30年前に以下のように述べている。
The chromatographer should beware of becoming so in love with his technique that he neglects other methods of separation. Other methods are usually more adaptable when large quantities are in question. A.J.P Martin (Nobel Laureate),1975
確かに化学工学的には溶媒抽出のような平衡分離のほうが効率的であるが、バイオ医薬品分離プロセスではクロマトグラフィーが主体となる（その理由については今回は割愛）。Martinといえどもタンパク質バイオ医薬品の登場は予想できなかったのであろう。しかし彼の、"The chromatographer should beware of becoming so in love with his technique"というところは気に入っており、今回の題にしたわけである。別に某プロ野球監督のマネではない。
現在でもchromatographyはscienceではなくてartであると言われる。（私もartistでもかまわないのではあるが、）今後も、クロマトグラフィープロセスの工学的研究に貢献できればと思っている。
Chromatography- I love it.

追記1

Marcel Dekker社は3年ほど前にTaylor&Francis社に買収されて現在は社名としては残っていない。副社長のRusell Dekkerとは後に日本や米国でしばしば会ったのではあるが、現在は経営には関与していないようである。Dekker社や他の出版社の1930年代後半からの歴史も第2次世界大戦の影響を受けて波乱に飛んでいる（J.Polymer Science,vol.26,xv-xvi,1988）。この記事では、Kirk－OthmerのEncyclopediaがどうして発刊されたかについても触れている。

追記2

「Ion Exchange Chromatography of Proteins」の改訂版はどうなっているのか、と、ときどき外国で聞かれる。実はDekker社とは1998年に出版する予定で契約したのだが、実現できなかった（初版から10年）。今回Taylor&Francis社から再度、問い合わせがあり、2008年目標（初版から20年!!）で執筆すると約束した。J.C.Giddingsの「Dynamics of Chromatography」という有名な本がある（1965年出版）。この本を良く見るとPartⅠとなっている。GiddingsはPartⅡを作るつもりだったが、30数年間実現できないままに逝去した。さて私はどうであろうか？

追記3

Marcel Dekker社が出版していた学術雑誌で有名なものに"Separation Science and Technology"がある。創刊以来編集長は上記J.C.Giddingsであったが、彼が病床にあるとき2代目を決めることになりaggressiveな人間ということでSteven Cramerが引き受けることになった。同時に私もEditorial board memberとして参画することになった。世の中は不思議である。広いようでも狭い。

追記4

Synergenはスケールアップは成功したがビジネスは失敗した。クロマトグラフィーモデルは良かったがビジネスモデルが悪かったと、私は言うことにしている。ちなみにSynergenは現在はAmgen傘下でAmgen Coloradoという社名となり結果としては存在している。

追記5

おもしろいかどうか疑問ですが、ホームページのURLです。
http://shu.chem.yamaguchi-u.ac.jp/
ちなみに10年近く前にT社のユーザー向け冊子に6回ほどコラムを連載したことがある（通しタイトルはDiffusion。つまらない情報は拡散して消失するということとクロマトグラフィーでは拡散が分離を支配するということをかけたつもりだが、その意味がわかった人がいるかどうかは疑問）。このコラムを読んだ人は予想以上に多く、それ以降、多数の人に読んでもらうには学術雑誌ではなく、こういう軽いものが良いのだと認識した。今回、このコラムが何人の人の目にとまるかはわからないが。周知のことと思うが、コラムとクロマトグラフィーのカラムは同じ単語なのに、どういう訳か違う表記と発音になっている。類似の例としては、女優オードリー・ヘップバーンとヘボン式カタカナがある。

Concept 3

シグナル伝達 —Signal Transduction—

実験室レベルで行えるマルチプレックスアッセイ系の構築

バイオ・ラッドではビーズベースのマルチプレックスアッセイ試薬、Bio-Plexアッセイをサイトカインと細胞内シグナル因子を中心にキット化し好評を博しています。しかしながら、この手法の広がりと共に、最近ではそれらに含まれないターゲットの測定を希望される研究者の方が増えています。そのような要望に応えるのが、アミンカップリングキットとCOOHビーズです。

アミンカップリングキット

サスペンションアレイテクノロジーでは、測定対象と特異的に反応するプローブをビーズに結合できれば理論的には自由にマルチプレックスアッセイ系を構築することができます。しかしながら、実際には活性を保持した状態でビーズへのカップリング反応を行なう必要がありますのでバッファー類の条件検討は必須です。Bio-Plexアミンカップリングキットは、ビーズへのタンパク質のカップリングを目的として弊社R&D部門が最適化したバッファーのセットです。カップリングプロトコールも付いていますのでスムーズに実験が行なえます。アミンカップリングキット1キットでカップリング反応30回分です。

COOHビーズ

表面がカルボキシル基でコーティングされた蛍光ビーズです。色分けにより100種類を取り揃えています。1ml入りのチューブ1本でカップリング反応10回分です。

カップリングの手順

1. タンパク質の調整

カップリングさせるタンパク質は水溶性、分子量6～150kDである必要があります。アジ化ナトリウム、BSA、グリシン、Trisその他アミン系の化合物が含まれないPBSバッファー（pH 7.4）に保存します。

2. カップリング反応

EDC（1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride）でビーズ表面のカルボキシル基を活性化したのち、反応中間体をS-NHS（N-hydroxysulfosuccinimide）で安定化します。反応中間体はタンパク質の1級アミンと反応しアミド結合を形成します。カップリング反応後のビーズは4℃で～1年まで保存できます。

3. カップリング反応の評価

カップリング反応後のビーズ数をカウントし、反応効率をBio-Plexサスペンションアレイシステムで検討します。

キットの詳細な内容、実験に関するご相談をご希望の方は弊社までお問い合わせください。

Special Interview

岩手医科大学　医学部　病理学第二講座
助教授 **前沢 千早** 先生

岩手医科大学・医学部のオープンリサーチセンターでは、「老年疾患克服に向けた探索的医療プロジェクト」をテーマに、多くの研究者・臨床医が講座横断的研究を展開しています。現在、複数のサブプロジェクトが進行中ですが、2型糖尿病や動脈硬化といった生活習慣病と自然免疫応答関連遺伝子との関連解析は、プロジェクトの中心的なテーマとなっています。しかし、一口に自然免疫応答といっても複数のサイトカイン・ケモカインが関与し、それらの細胞内シグナル伝達系ネットワークの複雑さは混迷を極めています。まさにカオスというべき状況であり、この分野での査読者の要求は標的分子・解析方法のいずれをとっても多岐におよび、年々エスカレートしてきている感があります。多分子の同時解析による研究のスピードアップは、査読者の厳しい要求に答えなければならない研究者にとって必然のニーズとなっています。

我々も肝線維症（肝炎・肝硬変）において、線維化に重要な役割を果たす肝星細胞（hepatic stellate cell： HSC）を標的として研究を推進しています。HSCは炎症細胞や肝細胞から放出される、TNF α やTGF β などのサイトカインや増殖因子の作用によって活性化され、肝の線維化を誘導します。免疫応答の制御因子であるinterferon γ（IFN-γ）は、HSCを活性型から静止型に形質転換させる作用があります。我々は、IFN-γ の持つ形質転換作用の分子機構について、プロテオーム・トランスクリプトーム的手法を用いて、網羅的に解析を行いました。その結果、複数の経路が明らかになりましたが、その中でも最も注目した経路は、「IFN-γ がTACE（TNF α converting enzyme）の発現減弱を誘導し、HSCからの可溶化TNF α のプロセシングを抑制する」というものでした。直ちにオープンリサーチセンターの共同研究機器として導入されていたBio-Plexのシステムを使い、培養上清中のTNF α 濃度を測定することにしました。Bio-Plexのシステムの利点である「微量のサンプルからの解析」という特徴を最大限に生かし、培養上清からの経時的なサンプルの採取によって、実験時間の大幅な短縮ができました。さらに、あわせて計測した他のサイトカインの中からHSCではこれまでに報告されていないclass Ⅰサイトカインの分泌も明らかとなり、IFN-γ のシグナル伝達系と他のシグナル伝達系とのクロストークの研究を展開するきっかけともなりました。まさに多項目・同時測定が生んだ副産物といえます。

現在、これらのシグナル伝達系の解析にBio-Plexのシステムの応用も考慮していますが、関連試薬のラインナップには不満の残るところであります。また、我々のプロジェクトの対象疾患はメタボリックシンドローム関連の疾病が多くあります。脂質関連のタンパク質解析用の試薬が充実すれば、患者様からの血清、血漿を用いた臨床研究への展開も望めます。開発研究は精力的に続けられているとは聞きおよんでいますが、日本での研究支援体制の充実とあわせてお願いしたいと思います。

Concept 4

社会と教育 —Society and Education—

環境微生物への分子生物学的アプローチ

注目されている微生物群集解析

地球上のあらゆる環境には驚くほど多くの微生物が生息しています。その微生物群集から有用な微生物を見つけ出し、バイオレメディエーション（微生物を活用した環境浄化）や医薬品開発などに利用されてきています。そのような微生物を見つけ出すために、最近は分子生物学的なアプローチが多用されるようになってきました。特に微生物群集解析にはPCR-DGGE（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis）法が多く行われています。この方法はクローニングして、それぞれを配列決定する手法に比べて、群集間の比較を迅速に行うのに適しています。

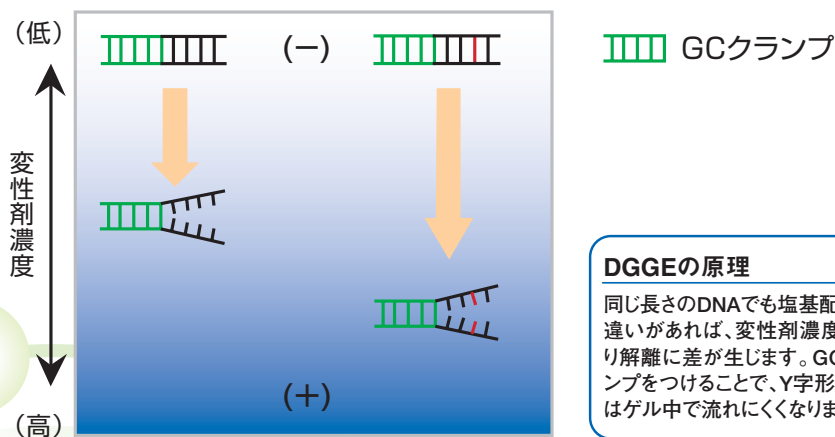
群集解析に有用なPCR-DGGE

DGGEは、変性剤（尿素、ホルムアミド）に濃度勾配をつけたアクリルアミドゲル電気泳動です。本法を利用することで、塩基配列の違いにより同じ長さのDNAでも、分離することが可能です。

GCリッチな配列であるGCクランプがついたプライマーでPCRを行い、それにより増幅された2本鎖DNAを変性剤濃度勾配ゲルにて電気泳動を行うと、特定の変性剤濃度域でGCクランプ以外の2本鎖部分は解離します。GCクランプは結合が強いため、ちょうどY字のような形になります。ゲル中ではY字形のDNAは泳動されにくくなり、結果的に塩基配列が同じであるDNAはバンドを形成することになります。

GCクランプ

DGGEの原理

同じ長さのDNAでも塩基配列に違いがあれば、変性剤濃度により解離に差が生じます。GCクランプをつけることで、Y字形DNAはゲル中で流れにくくなります。

微生物群集では、16s rDNA遺伝子をターゲットとしてわずかな塩基配列の違いで微生物種をバンドパターンとして示すことができます。さらにバンドを切り出して、シークエンシングを行うことで、微生物種を特定することもできます。

バイオ・ラッドは社会に貢献できる製品とサポートを提供しつづけます

微生物群集解析におけるDGGEはサンプル間での比較が容易にできることから、さまざまな分野へ応用されています。環境の違いによる微生物の生態を調査するためのひとつの手法として定着しつつあります。

たとえば河川、海洋、土壌などでの微生物の群集解析を行うことで、環境浄化状況を知る手段のひとつとして用いられています。

また食品分野でも、より有益な菌（乳酸菌など）を得るためや食品衛生上問題となる微生物の解析にDGGEを活用する動きがあります。口腔内細菌や腸内細菌の解析などの医療分野でもDGGEは有効に利用されています。

バイオ・ラッドのDCode微生物群集解析システムはDGGEをより簡便に実施できる製品です。今後もバイオ・ラッドは社会に貢献できる製品およびサポートを提供しつづけていきます。

DCode システム

Special Interview

愛媛大学　沿岸環境科学研究センター
教授　**鈴木 聡** 先生

現在のご研究テーマについて

「水圏環境での微生物とその遺伝子の挙動（ダイナミクス）を調べるのが研究テーマですが、それに即して主に3つの研究を進めています。
1番目が薬剤耐性遺伝子であるテトラサイクリン耐性遺伝子のうちribosomal protection protein（RPP）遺伝子に関するものです。臨床や畜産では広く分布していることが知られていますが、海では調べられていませんでした。現在はRPP遺伝子を持つバクテリアの分布を調査しています。対象地域としては、瀬戸内海の養殖場、養殖場がなく薬剤の影響がない太平洋の底泥、文部科学省のプロジェクトで行っているメコン川流域などです。広範囲にRPP遺伝子を持つ耐性菌が存在していることがわかってきました。
2番目の研究としては、海の中の溶存態タンパク質の起源と分解過程を調べています。海水の中のタンパク質を電気泳動すると、数十種類しか検出されません。ヒトの病原菌である緑膿菌のポーリンタンパク質がその中に見つかりましたが、調べてみると緑膿菌は海洋にも普通にいる細菌であることがわかりました。緑膿菌をはじめ、いくつかの菌のポーリンタンパク質が海水中で分解されず、残っている謎を調べています。
3番目は、環境汚染物質である有機スズに対する環境微生物の応答（耐性や分解能獲得）を解明する研究です。
最近あたらしい耐性遺伝子が見つかりましたし、有機スズ耐性菌は他の化学物質によっても増加すること、堆積物中ではなぜ有機スズ分解が起こりにくいのかも分かりつつあります。
元々微生物がどのように環境適応して生きているのかという点に興味があり、水圏環境と人間環境のあいだでの微生物や遺伝子の循環を知りたいというのが最終的な研究目標です。
例えば、ヒト側でも環境側でも全く同じ薬剤耐性遺伝子が見つかっていますが、環境中の微生物の持つ薬剤耐性遺伝子が飛び回ってヒトの病原菌までたどりついて薬剤耐性を持つ可能性も考えられます。」

微生物群集解析でのDGGEについて

「微生物の群集構造解析にDCodeを用いるようになったのは6年前に愛媛大学に移ってからです。薬剤耐性遺伝子の研究では、どのような菌がいるのかという全体像を把握するためや、薬剤耐性遺伝子そのものの多様性を見るためにDGGEを用いています。また海洋堆積物中の微生物の群集構造解析には16S rRNA遺伝子をターゲットとしてDGGEを実施しています。DGGEは培養せずにプロファイルできるし、バンドを切り取ってシークエンシングもできるので研究手法として非常に有効で、天然サンプルだけでなく実験生態系を経時的に追いかけていく場合にも便利です。」

教育する側として、現在の教育現場について

「この沿岸環境科学研究センターは工学部、農学部、理学部の先生を集めて設立され、各学部から独立した組織ですが、私は農学部と理学部で授業を担当しています。両学部でそれぞれ個性が違いますが、共通して今の学生には時間の観念がなくなっているのではないかと感じます。ネットですぐに情報を得ることの影響ではないかと考えています。いつでも情報を得ることができるために、時間という目盛りがない生活をしている人が多いようです。ここ数年で大きく時間に対する価値観が違ってきた感じがしますね。
また、本来であれば大学の3年までの知識を蓄積して、4年生になってそれを応用して研究していくのですが、暗記するだけで終わっていて、知識を使えない人が増えています。実際に手を動かして、よく実験を行っている学生は自分の頭で考えて研究しています。私はこれまで4つの大学に勤務して来ましたが、学生実験をしっかりしているところとそうでないところで卒論以降の応用力に差があるようです。」

研究支援メーカーに対して

「バイオメディカル以外の分野の研究者に対するサポートも重視していただきたいと思います。例えば環境科学でいうと、様々な環境から非生物態のDNAやタンパク質を回収するのが困難なケースが多いので、様々なケースのデータを蓄積し、アドバイスできるのがメーカーが持つべきノウハウではないかと思います。
装置などは便利になってきましたが、ブラックボックスの部分が多くなりすぎているかなと思います。もっとシンプルな製品があってもいいのではないだろうかと感じます。」

User's Voice

DCode

組換え体が安全であるためには、組換え体が非組換え体と同じであることだけでなく、環境に対する影響について、組換え体が非組換え体と同じであることが必要になりました。環境に対する影響を調べるために、今まで菌の生存期間が同じであるかどうかなど別の点について調べていましたが、より明確なデータを出す為に遺伝子レベルで調べることにしました。DCodeを用いてDGGEを行っています。（食品関連研究所 A様）

生ゴミを堆肥に変える際に働く新種のバクテリアを発見するために、堆肥中のバクテリアについて、群集解析を行っています。
（農業系大学 Y様）

乳酸菌研究にDCodeを用いていますが、DCodeの使用方法について、食品メーカーの方にも教授しています。それぞれの企業では品質管理にDCodeを用いる予定のようです。（農業系大学 E様）

大日本住友製薬株式会社
研究本部　ゲノム科学研究所 **金岡 昌治** 所長

−Interview−

今回は、「先を読む」第3回といたしまして、大日本住友製薬　ゲノム科学研究所　金岡昌治所長とのインタビューをお届けします。
今回は、産業界の研究のトップでご活躍されていらっしゃいます金岡昌治所長へ、インタビューさせていただきました。大日本住友製薬様は2005年10月に合併され、金岡様にはお忙しい中、今後の海外市場への展望、今後の重点領域など、貴重なお話をお伺いいたしました。

日本のトップ医薬メーカーとしての今後の開発状況につきまして、お聞かせください

一般的な医薬業界の今後としては、日本では、医療費の抑制などがあり市場が伸びないなかで、成長しようと思えば、グローバルな視点として海外マーケットを求めていかなくてはならない状況にあります。海外のマーケットでは売上も大きく見込めますが、かかわる開発コストについても大きくなってきています。一剤出すのに、数百億円のコストがかかり、それを負担していかなければならない状況です。一方では、ここ数年FDAなどで新薬が承認されるのは、年間10数剤しかなく、新しい化合物の薬としての開発が難しくなってきています。これはサイエンスに基づく有効性、安全性の証明が従来以上に厳しく求められてきていることによります。
そのなかでも、新薬メーカーとして生きていく、そのためにはグローバルに通用する医薬を作っていかなくてはならない。昨年合併したひとつの大きな理由として、グローバルな開発コストを住友、大日本がそれぞれ単独では担いきれないという実態がありました。
医薬品の開発はコスト、時間がかかっていますが、今後は研究開発コスト、速度および確度の向上が課題です。

その3つの課題に対して、ゲノム科学研究所の役割として、技術革新の期待、ニーズがおありになると思いますが

それは大いにあります。ゲノム科学研究所に求められているのは、当社の医薬が持っている特長をモレキュラーレベルできっちりと証明し、そのエビデンスに基づき他社剤との違いをより早く、より確実に証明していくことにあります。
また具体的にはもう少し先になると思いますが、患者さんに応じた投薬の方法、副作用面でのケアなど、そういうところへ技術を使っていく、ということもあります。それにより成功確率の高い研究開発へのサポートをしていくという役割となります。

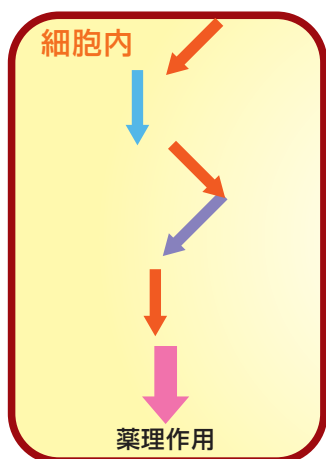
過去の歴史を見て、予期せぬ副作用などでお蔵入りになっていた開発品などがファーマコゲノミクスのアプローチから再度検討されること。もしくは、少ないターゲットをはじめから狙った医薬品の開発などお考えでしょうか

そういうマーケットを狙う動きはベンチャーなどが行なっているとは思いますが、当社では今のところその狙いはありません。むしろ、そういう問題の少ない化合物の選択にゲノミクス関連の技術を活用したいと考えています。薬がどのように作用しているか、という薬理作用の面で、最近の技術を使いますと、はるかに幅広く生体内で何が起こっているか、見ることができるようになっています。そうするといままで気がつかなかったことでどんなイベントが起きているか、副作用に繋がることも含めて広く見られるようになってきています。こうした情報を早期段階での化合物選択に活用したいのです。

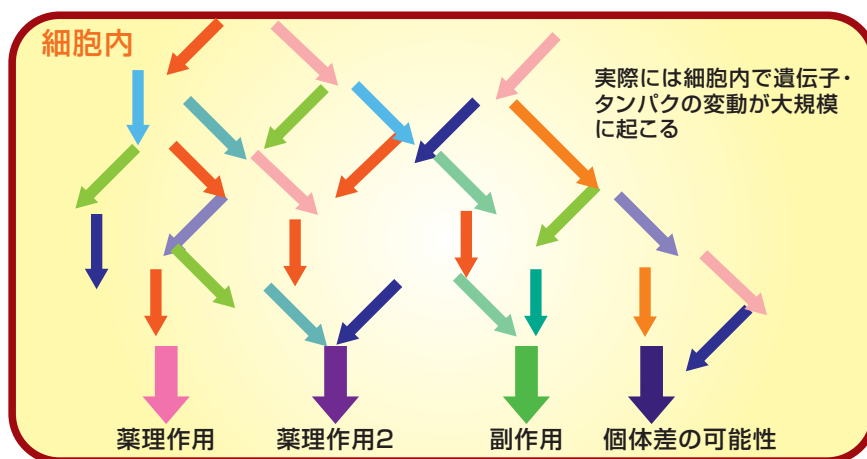
官―民の連携について、どのようにお考えですか

自社だけではできない大きなプロジェクトには、例えば、トキシコゲノミクス、創薬プロテオームファクトリープロジェクトには参加しています。大きな資金とたくさんのサンプルを使ってジェネラルなバックグラウンドとなるようなデータを蓄積するような研究は、

ポストゲノム研究における生体内機能の解析

疾患の状態・薬が作用した状態

従来

全体像の把握は不可能
仮説を立ててそれを検証

想定外の現象に対応困難

従来　現在・未来

全遺伝情報の解明&解析技術の革新
網羅的な解析による全体像の把握が可能

メカニズム解明の手がかり

自社単独ではできないし、やる意味もないと考えています。広くシェアすればよいと思います。そういうところへは積極的に参加し、それをベースに自社の研究を活かしていきたいと考えます。

御社の研究周辺で、ルーチンで使っている、もしくはお役にたっている技術、ツールはどのカテゴリーをお使いですか

例えば、よく使っているジーンチップでは大量のデータがでてきます。ひとつはそれをマネージする事、もうひとつは、たくさんのデータの中から、われわれにとって必要な情報、例えば疾患にかかわる情報など、生物学的な意味合いを見出してくるツールとしてバイオインフォマティクスを使っています。ただ、データはでてきますが、それをどう活用するか、というところで詰まっていることがあります。もったいないのですよ。山のようなデータとして、細胞内、生体内で結果として起こっている遺伝子発現が見える、それぞれが時間軸や、条件としてスナップショット的には見えますが、それがどんな意味を持つのか、そのつながりというかイベントカスケードとしてはなかなか掴み取ることが難しいですね。そこをどう解析していくかが、課題です。基本的にはコンピューター、情報処理技術など使うのですが、まだ十分ではないですね。数年前と比べると進化してきてはいますが。

ウェット系の技術革新は進んでいるのですが、情報処理の技術が付いていかず、それが多くの研究者の悩みであると感じておりますが

そもそも生物学はこれまでこういう問題に出くわしたことがなかったんだと思います。

その中で、金岡さんがお感じになる、これからの注目する、または望む技術、開発、会社、商品などなにか、ございますか

いわゆるネットワーク解析は、進んできていると感じています。究極的には生体内で、どんなイベントが起きているかのデータを基にシミュレートできるようにいければと考えています。まだまだそういう点では、技術は伴っていないのですが、それを目指して日本でもシステムバイオロジーが進んできていますし、海外でもそれを狙って研究しているグループも見られます。

日本でもそれを目指しているグループはあります。
また、ネットワークのデータを得るための文献マイニングということが必要になっています。コンピューターで行なうことと、人手を使用した方法がありますが、人手の方が質が高く、確実性も高いのですが、一方コンピュータの方が網羅性は高いため、私たちは両方のアプローチを行ない精度を高めています。

研究の出口でなく、入り口について、たとえば前処理などで何か、ご要望などございますか

ジーンチップなどでは、特にボトルネックにはなっていませんが、それに至るまでの、動物に投与してサンプリングしてくる過程などは、まだまだ時間がかかるところです。また、タンパク質レベルで網羅的に解析する、いわゆるプロテオミクス解析では、サンプル調製は、単に時間だけではなく、質も含めてまだまだ問題ですね。われわれでも改善の余地があるのですが、そこはバイオ・ラッドで何とかして欲しいところですね。ジーンチップなどで得られた結果から生体内でどういうイベントが起きているか仮説を立てて、そのあと通常のモレキュラーバイオロジーの手法を使って検証するのですが、ジーンチップなどで得られたデータはそこの検証部分の数も多く、そのスループットをもっと上げたいと考えています。例えばsiRNA、in situ hybridization、細胞への遺伝子導入は数が多く、そこのスループットも上げたいと考えています。その技術が欲しいところです。

このご要望は、アカデミアの研究者のニーズとしては、あまり多くは無いように思いますが

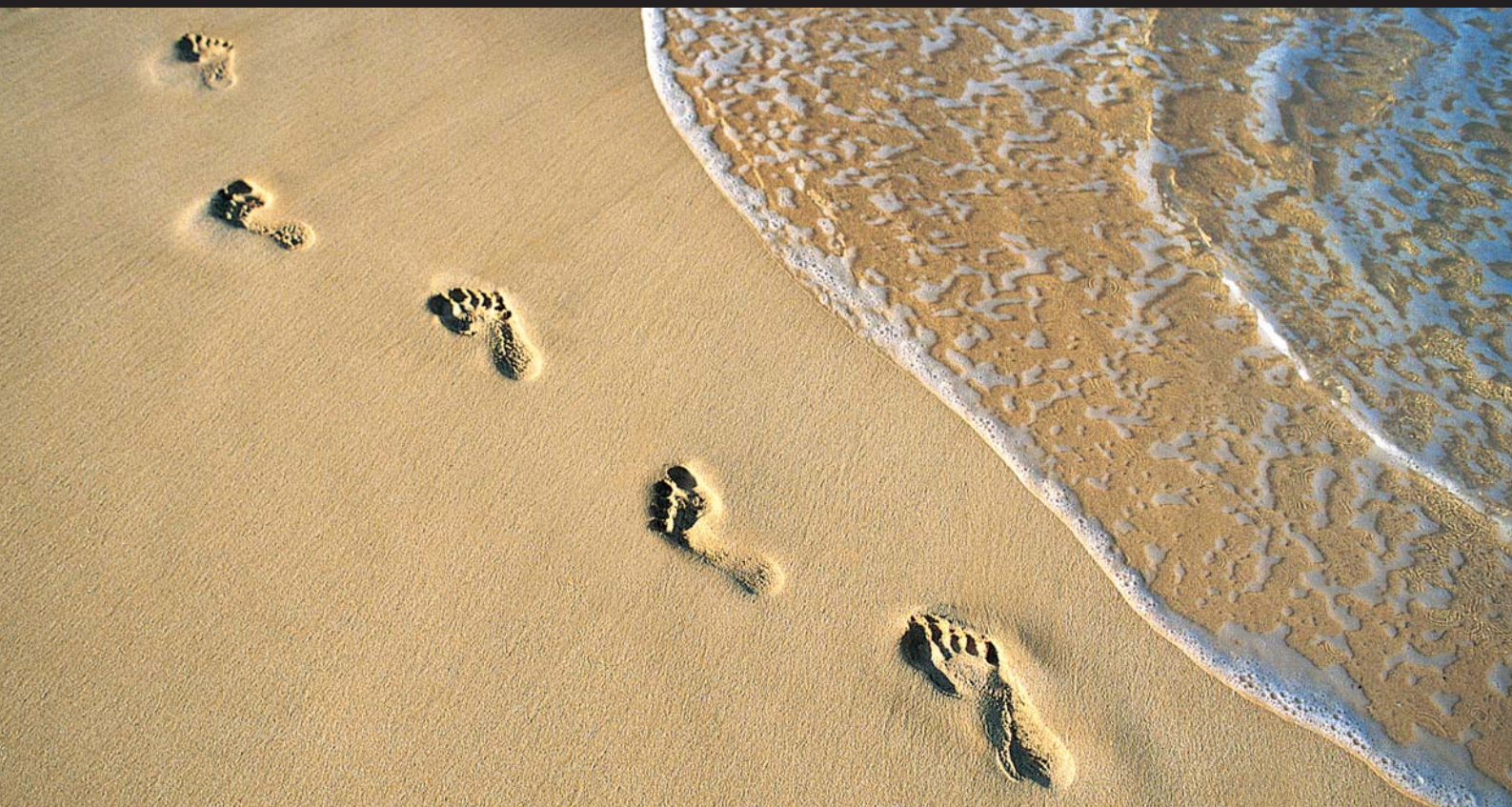
アカデミアでは、想像ですが、仮説を立てて検証をしていくといった段階で、フォーカスするエリアを絞り込み、われわれほど幅広く見る必要が少ないのではないでしょうか。

最後に御社の今後の研究開発の方向性についてお聞かせください

グローバルな製品開発を目指して重点領域を設定し、そこへより多くのリソースを配分していくことになると思います。重点領域としては、いまのところ糖尿病、中枢神経領域を考えています。合併により、この製品が厚くなっています。

本日は、貴重な時間ありがとうございます

金岡所長にお話を伺って

このシリーズ記事が開始されてから初めて今回は製薬企業の研究開発の最前線でご活躍されている方にお話を伺いました。アカデミアの研究者の方と際立って異なった視点があるとすれば、企業活動として当然行われる投資→回収サイクル、および投資回収率の極大化を常に意識しなければならないこと、また、その時間軸を縮め競合他社との競争に打ち勝つという大きなプレッシャーを常に受けながらの研究活動であることと思います。
金岡所長が、製薬企業の研究開発活動の要諦として、『コスト』、『速度』、『確度』を上げられたことが大変印象に残りました。
われわれ、研究支援産業としては、アカデミアでの最先端研究支援と同時に、商業化を見据えた企業のこうした研究開発活動のニーズを踏まえた製品・サービス提供することが必要なことを痛感しました。
大日本住友製薬様、また、金岡所長率いるゲノム科学研究所の今後のますますのご発展をお祈り申し上げます。
（2006年1月インタビュー）　鈴木貞史

一歩ずつ、確実な精製でステップアップ

バイオ・ラッドのサンプル調製キットは、簡単に、再現性よく目的のタンパク質を分画・精製します。

バイオ・ラッドは、化学特性を利用したReadyPrepキット、スピンカラムタイプのAurumキット、2つのラインアップでサンプル調製をサポートします。サンプル調製キットを用いることで、ターゲットタンパク質を濃縮し、発現量の低いタンパク質の検出が可能になります。

■ **ReadyPrepキット**

・細胞内局在に基づく分画

タンパク質の細胞内局在に応じて、膜タンパク質や核タンパク質などを特異的に分画します。

・溶解度の違いに基づく分画

溶解度の違いを利用して、サンプルを1～3分画します。

■ **Aurumキット**

・アルブミン、IgGの除去

アフィニティー活性を利用して、血清中の発現量の高いアルブミンとIgGを除去します。

・電荷の違いに基づく分画

陽イオン、陰イオン交換クロマトグラフィーの原理で、簡便にスクリーニングを行うことができます。

液相等電点電気泳動装置

マイクロロトフォア

マイクロロトフォアはゲルを使用せず、液相で等電点電気泳動を行う装置です。分離したサンプルは吸引することで1度に10フラクションに回収することが可能です。ゲルを支持体とした場合に分離が難しいと言われる、膜タンパク質や高分子タンパク質をはじめ、発現量の高いタンパク質を含むサンプルを分離する際に有効です。また、クーリング機能がついているため、Nativeな状態でタンパク質を分離することも可能です。分取や精製の目的だけではなく、電気泳動やクロマトグラフィー、質量分析の前処理に使用することで、発現量の低いタンパク質の検出・同定を可能にします。

- **液相での電気泳動**
  ゲルと異なり、分子量の大きさに制限を受けません。またゲルに比べ、高い回収率でタンパク質を分取することが可能です。
- **少量サンプル設計**
  少量のサンプル（約2.5 ml、μg-数mg）を、pHの異なる10フラクションに回収が可能です（200-250 μl/フラクション）。
- **キャリアアンフォライトによる連続したpH勾配**
  目的のpHレンジに合ったキャリアアンフォライトを選択することで、分離能を高めることができます。pH勾配は直線性が得られるため、連続したpHでタンパク質を分離します。また、ランニングコストを最小限に抑えることが可能です。
- **ペルチェによる温度制御**
  ペルチェ素子により、20℃と10℃の温度制御が可能です。IEF中の温度上昇による化学的修飾を防ぐことができます。
  また、Nativeな状態で電気泳動を行うことも可能です。
- **省スペース設計**
  ペルチェ素子に覆われたフォーカシングチャンバーとハーベストボックスが一体となった構造で、29.5×18.8×16 cm、2.85 kgのコンパクトサイズです。

液相等電点電気泳動に関する多くの文献が報告されています。また、技術的資料を多数ご用意しております。
詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください。

報告例

- **膜タンパク質の分離**
- **Nativeな状態での分離**
- **分離後のMALDI-TOF MSおよびLC-MS／MSでの同定**
- **2次元電気泳動前のプレ分画**

Ordering Information

品　名	カタログ番号	価　格
マイクロロトフォア	170-2800	¥490,000

蛍光イメージング装置

PharosFX/PharosFX Plus

PharosFXシステムは最大3波長のレーザー光源が搭載可能な蛍光イメージング装置で、
ゲル、メンブレンなどの核酸、タンパク質の蛍光検出が可能です。

PharosFXシステムの主な特長

- 独自の光ファイバー方式（特許）によって効率良く励起レーザー光を誘導。ミラー方式のレーザー誘導に比べてより正確で定量性の高いデータが得られます。またオートアライメント機能により、自動で正確にレーザーのアライメントが行えるので、最良の状態でレーザーを誘導することができます。
- 独自のダイレクトスキャニング&ファイバーデリバリー方式を採用。ゲル中にある立体形のスポット、バンドの正確なデータを得ることができます。
- 励起レーザー光は1波長（532 nm）、2波長（488 nm、532 nm）、3波長（488 nm、532 nm、635 nm）の3タイプから選択可能。購入後に追加することも可能です。PharosFX Plusシステムは蛍光検出に加えてイメージングスクリーンを使ったRIの検出も可能なシステムです。
- ゲルやメンブレンの他にもマイクロタイタープレートや1.5 cm厚までのシャーレ、低蛍光ガラスではさんだゲルを検出できます（オプションの専用サンプルトレイが必要です）。

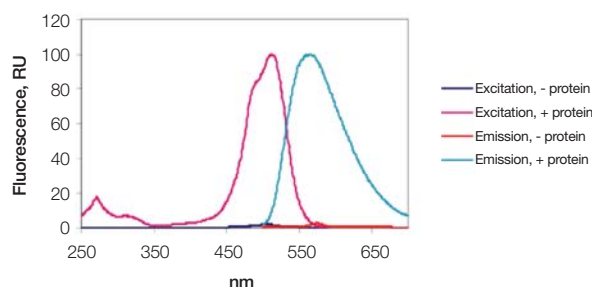
Ordering Information

品　名	カタログ番号	価　格
PharosFX システム		お問い合わせください
PharosFX Plus システム		お問い合わせください

タンパク質用蛍光ゲル染色剤

Flamingoゲルステイン

Flamingoゲルステインはタンパク質用の蛍光染色剤です。蛍光染色剤は感度・定量性がともに高く、再現性・操作性が非常に優れているため、ゲル染色剤のスタンダードの1つとなっています。Flamingoゲルステインは下記特長を持ち、発現量の低いタンパク質の検出・同定、定量的データの解析を可能にします。

- **高感度**
  感度は最高0.25 - 0.5 ngで、発現量の低いタンパク質を検出することが可能です。
- **低バックグラウンド**
  従来の染色剤に比べてバックグラウンドを低く抑えることができます。そのため、UVで励起させCCDカメラで長時間露光することにより、タンパク質を検出することが可能です。
- **簡便なプロトコール**
  2ステップのプロトコールで、簡単に染色することができます。長時間染色しても、過染色されません。
- **高い定量性**
  3オーダーの幅広いダイナミックレンジにより、定量性の高い結果を得ることができます。
- **MSコンパチブル**
  染色後、質量分析のアプリケーションに対応可能です。
- **低価格**
  従来に比べてランニングコストを抑えることができます。

Flamingoゲルステインの蛍光スペクトル
タンパク質の存在下で、Flamingoゲルステインの蛍光色素は512nmと271nmに励起のピーク、535nmに蛍光のピークを示します。

プロトコール

ステップ	試薬	容量*	時間
①固定	10％ 酢酸	200 ml	＞2時間
	40％ エタノール		
②染色	1×Flamingoゲルステイン	100 ml	＞3時間

染色後0.1％（w/v）Tween20 200 mlで10分間脱色することで、バックグランドを抑えることができます。
*容量は、ゲルサイズ9×12 cmを染色する際に必要な容量の目安です。

仕様

感度	0.25 - 0.5 ng
定量性	3オーダー
MS対応	可能
プロトコール	2ステップ
操作時間	5時間以上
Excitation 波長	512 nm
Emission 波長	535 nm
原液	10×濃縮液 使用時に精製水で希釈
保存温度	4℃

Ordering Information

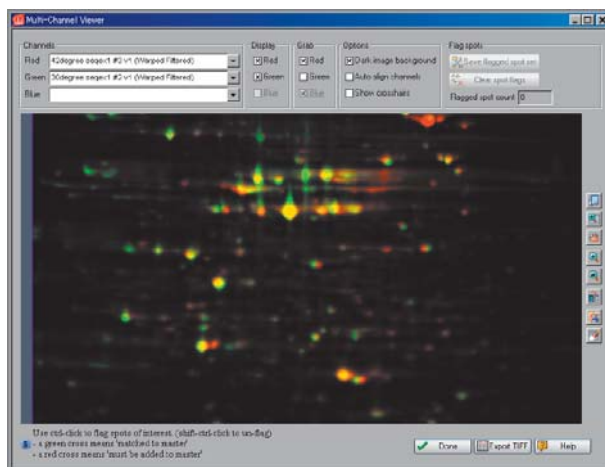
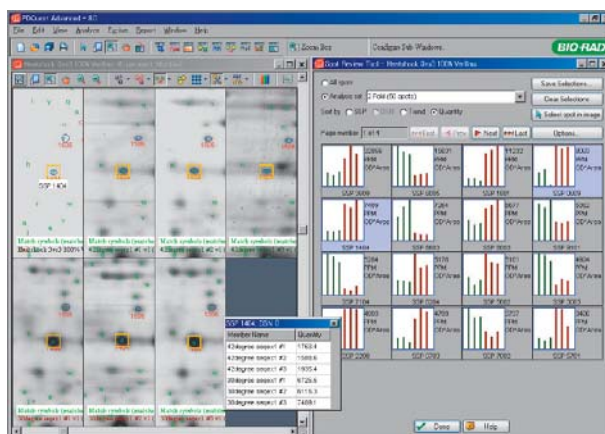
品　名	希釈後容量	保存温度	カタログ番号	価　格
10×Flamingoゲルステイン　20ml	200ml	4℃	161-0490	¥7,000
10×Flamingoゲルステイン　100ml	1L	4℃	161-0491	¥23,000
10×Flamingoゲルステイン　500ml	5L	4℃	161-0492	¥99,000

2次元電気泳動画像解析ソフトウェア

PDQuest™8.0 Advanced & Basic

PDQuestは2次元電気泳動のゲルイメージをまとめて解析するためのソフトウェアです。解析を迅速かつ快適に行うための機能が満載されています。
最新のVersion8.0では、画面に表示されるウィザードが次に何をすればいいかを教えてくれます。ウィザードに従ってクリックしていくだけで、スポットの検出から発現量比較解析までを自動的に行うことができるようになりました。もちろん従来の様に研究者が自由に解析を行うことも可能です。またこれまでのバージョンよりも情報表示能力が強化され、ディファレンシャルを視覚的に認識しやすくなりました。

機能別に2つのライセンスをご用意いたしました

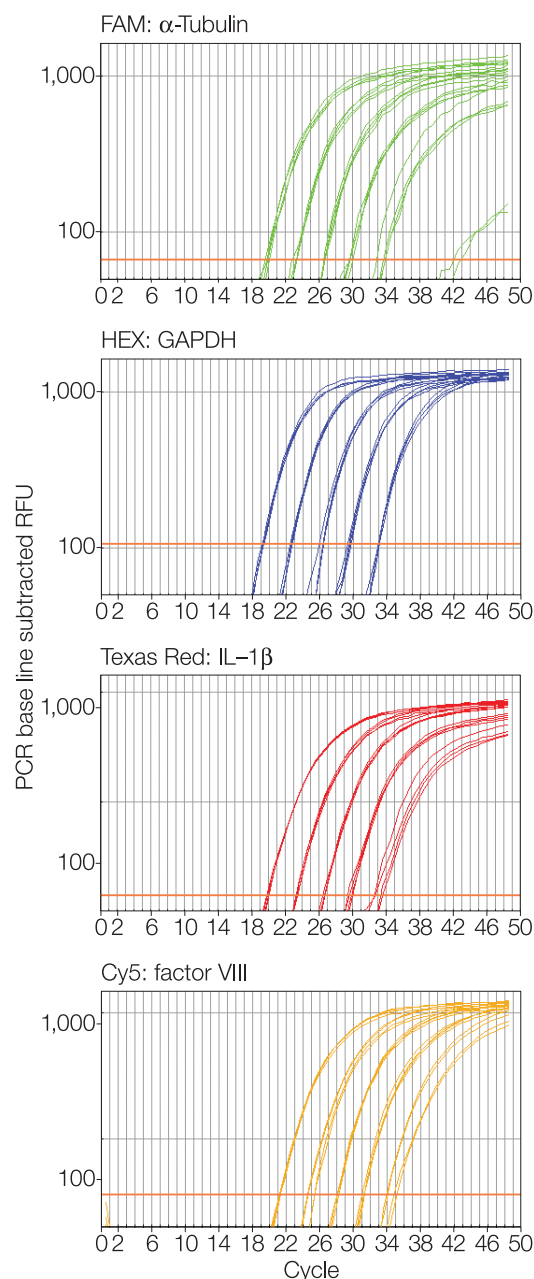
PDQuest Ver 8.0では解析を迅速に行うための機能をすべて盛り込んだAdvancedライセンスと、必要な機能だけに絞り込んだBasicライセンスの2系統のライセンスをご用意いたしました。
Basicでは少数のゲルを簡易解析するための機能に特化させることで低価格化を実現しました。
Advancedでは新しく搭載したイメージワーピング機能によりBasicよりも高いマッチングレート（一致率）を得ることが可能で、解析時間を短縮することができます。さらに3色のマルチチャンネルでスポットを重ね合わせてディファレンシャルを視覚的に捉えることもできます。PDQuest Advancedは大量のゲルを詳細に解析したい研究者のニーズにも応える事が可能です。
PDQuest Ver8.0は無料体験版をご用意しております。ご希望の方は03-5811-6271までご連絡ください。

Ordering Information

品　名	カタログ番号	価　格
PDQuest 8.0 Advanced Software	170-9630J1	¥1,800,000
PDQuest 8.0 Basic Software	170-9620J1	¥980,000

マルチプレックス　リアルタイムPCR試薬

iQ Multiplex Powermix

iQ Multiplex Powermixは、1チューブ内で複数ターゲットを検出するマルチプレックス・リアルタイムPCRを簡便に実行可能にします。シングルプレックスと同等の増幅効率を得ることにより、スループットを上げ実験データのアウトプットを最大限に引き上げることができます。

- **4ターゲットでの信頼性の高いマルチプレックス・リアルタイムPCR を実現**
- **テンプレートとしてcDNAでは6オーダー以上、ゲノムDNAでは4オーダー以上の直線性**
- **4ターゲット検出において、発現量が10^6倍違う遺伝子間でもお互いの影響なく検出可能**

図．iQ5リアルタイムPCR解析システムにおける4ターゲットの直線性
ヒトゲノムDNAの10倍希釈系列（0.5 ng～50 pg/50 μl/1反応）をiQ Multiplex　Powermixを用いてアッセイを行いました。α-TubulinはFAM標識プローブにて検出（増幅効率＝96.4％、r^2＝0.998）、GAPDHはHEX標識プローブにて検出（増幅効率＝94.9%、r^2＝0.999）、IL-1βはTexas Red標識プローブにて検出（増幅効率＝101.8%、r^2＝0.999）、Factor Ⅷ はCy5標識プローブにて検出（増幅効率＝101.6%、r^2＝0.997）

Ordering Information

品　名	保存温度	カタログ番号	価　格
マルチプレックス　リアルタイムPCR試薬			
iQ Multiplex Powermix 50反応分	－20℃	170-8848	¥28,000
iQ Multiplex Powermix 200反応分	－20℃	170-8849	¥88,000

遺伝子導入試薬

COSFectin Cell-Specific Lipid HEKFectin Cell-Specific Lipid

COSFectin/HEKFectin Cell-Specific LipidはCOSもしくはHEK 293に特化して開発されたトランスフェクション試薬です。TransFectin同様高い発現活性を示します。培地内の血清の有無に関わらず、優れたパフォーマンスを持っています。COSFectinはCOS-7、COS-1、COS-3細胞にて、HEKFectinはHEK 293、293H、293F、293T、293Phoenix、Bosc細胞にて、それぞれ評価試験を行なっています。

- **高い発現活性—汎用的なトランスフェクション試薬よりもタンパク質発現活性が高い**
- **低い細胞毒性—導入遺伝子の高レベルの発現活性を維持できる**
- **フレキシブルなプロトコール—血清含有、無血清培地ともに利用可能**

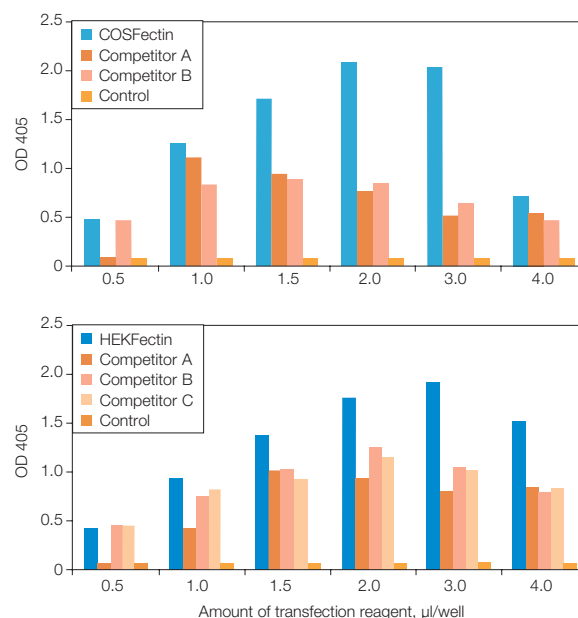



図. β-ガラクトシダーゼの発現における市販の細胞特異性試薬との比較
各細胞にpCMV.SPORT-β-galをトランスフェクションし、24時間後にβ-ガラクトシダーゼ活性を測定しました。上図はCOS細胞での、下図はHEK293細胞での結果です。

Ordering Information

品　名	保存温度	カタログ番号	価　格
遺伝子導入試薬			
COSFectin Cell-Specific Lipid, 0.5 ml	4℃	170-3370	¥32,000
COSFectin Cell-Specific Lipid, 1.0 ml	4℃	170-3371	¥49,000
COSFectin Cell-Specific Lipid, 1.0 ml×5本	4℃	170-3372	¥158,000
HEKFectin Cell-Specific Lipid, 0.5 ml	4℃	170-3380	¥32,000
HEKFectin Cell-Specific Lipid, 1.0 ml	4℃	170-3381	¥49,000
HEKFectin Cell-Specific Lipid, 1.0 ml×5本	4℃	170-3382	¥158,000

Bio-Plex™ 200 システム

発売以来多くの研究者の方々にご愛用いただいているマルチプレックスサスペンションアレイシステム、Bio-PlexシステムがBio-Plex 200システムとしてマイナーチェンジされました。ニードルの高さ調節などのメンテナンスが容易に行えるようになったほか、本体パーツのいくつかに改良が加えられ耐久性が向上しました。もちろん、従来のBio-Plexシステムの長所はそのまま引き継いでいます。

- **さらに操作性が向上したBio-Plex™ 200リーダーとプラットフォーム**
- **最新バージョンのソフトウェア：Bio-Plex Manager™ 4.1**
- **USA FDA 21 CFR Part 11対応（Bio-Plex Manager™ 4.1 Security Edition）**
- **核酸関連のアプリケーションに対応したSNP Manager™**

Bio-Plex サスペンションアレイシステム構成品

1. アレイリーダー
2. マイクロプレートプラットフォーム
3. High-throughput fluidics（HTF）
4. モニター
5. PC
6. バリデーション、キャリブレーションキット
7. アッセイキット
8. MCVプレート
9. Reagentキット
10. COOHビーズ

Ordering Information

品　名	構成品	カタログ番号	価　格
Bio-Plex 200システム	アレイリーダー、マイクロプレートプラットフォーム、Bio-Plex Managerスタンダードソフトウェア、PC、モニター、キャリブレーションキット、バリデーションキット、MCVプレート、シース液	171-000201	お問い合わせください
Bio-Plex 200フルシステム	171-000201の構成品とHTFシステム	171-000205	お問い合わせください

Field of Choice

多数サイトカインの同時測定から、免疫システムの全体像解明へ…

Bio-Plex™サイトカインアッセイは、マイクロプレートの1ウェルで、微量の検体から複数のサイトカインを同時に定量することを目的としたアッセイ試薬です。従来のマイクロプレートELISAに比べ労力・コスト・サンプルを大幅に節約できるため、遺伝子改変マウスの血清や貴重な患者サンプルの有効な解析が可能となります。

Bio-Plex™

World of Information
From a Single Drop

Assays	Human	Mouse	Rat
IL-1α		●	●
IL-1β	●	●	●
IL-2	●	●	●
IL-3		●	
IL-4	●	●	●
IL-5	●	●	
IL-6	●	●	●
IL-7	●		
IL-8	●		
IL-9		●	
IL-10	●	●	●
IL-12(p40)		●	
IL-12(p70)	●	●	
IL-13	●	●	
IL-17	●	●	
Eotaxin		●	
G-CSF	●	●	
GM-CSF	●	●	●
IFN-γ	●	●	●
KC		●	
MCP-1(MCAF)	●	●	
MIP-1α		●	
MIP-1β	●	●	
RANTES		●	
TNF-α	●	●	●

こちらのリスト以外にも近日発売予定の項目がございます。詳細につきましては弊社までお問い合わせください。

Visit us on the Web at **discover.bio-rad.co.jp**
日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
ライフサイエンス事業本部　116-0014　東京都荒川区東日暮里5-7-18
TEL : 03-5811-6270　FAX : 03-5811-6272
Helping Science Serve Mankind

ラボチップ型全自動電気泳動システム Experion™を用いたタンパク質の分子量測定、定量および解析：SDS-PAGEとの比較

Karen Zhu, Marie Nguyen, William Strong, and Christina Whitman-Guliaev Bio-Rad Laboratories, Inc., 6000 James Watson Drive, Hercules, CA 94547 USA

はじめに

タンパク質サンプルの分析は、その分子量、濃度および相対的純度を決定するために必須です。現在、この分析手法として、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）が一般的に利用されています。SDS-PAGEでは多くのステップ～電気泳動による分離、染色、脱色、イメージング、定量解析～が必要で、これには膨大な時間を必要とします。通常は、このようなステップを完了するために、最低でも2～3時間、長い場合はオーバーナイトで実験を行います。

Experionシステムは、ラボチップのパイオニアであるCaliper Life Sciences社の画期的なLabChip分離技術と、感度の高い蛍光サンプル検出法を組み合わせて、タンパク質サンプルおよびRNAサンプルの迅速な自動化分析を行うことができます。Experionシステムでは、分離、検出およびデータ解析を一つのプラットフォーム内に統合することにより、時間のかかる“マニュアルでの”ステップの多くを省略することができます。タンパク質解析は、電気泳動用チップと、分子量10～260kDのタンパク質の分離と解析に必要な試薬を含むExperion Pro260分析キットを用いて行います。ExperionシステムとPro260分析キットを用いることにより、最大10種類までのサンプルを30分程度で分離し、解析することができます。Experion Pro260分析キットを用いる場合、従来のゲル電気泳動法に比べて4つの大きなアドバンテージがあります。

（1）結果が得られるまでの時間と作業時間が著しく短縮できる。

（2）必要とされるサンプルおよび試薬の量が少ない。

（3）正確で再現性の高い分子量測定と定量結果が得られる。

（4）通常のSDS-PAGEで使用する劇物（例：アクリルアミド）を取り扱う必要がない。

Experionシステムではさらに、相対サンプル濃度やサンプルの純度など、SDS-PAGEでは容易に得ることのできないサンプル情報を得ることができます。

今回のレポートでは、Experion Pro260分析キットの性能を、従来のSDS-PAGEと比較します。特に、検出感度、直線性ダイナミックレンジ、タンパク質分子量測定での再現性と正確性、定量の再現性、全般的な解像度などを、各々の方法で分析、比較しました。

方　法

タンパク質サンプル

精製したE. coli β-ガラクトシダーゼ、ウサギ筋ホスホリラーゼb、ウシ肝グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、鶏卵卵白アルブミン、ウサギ筋乳酸デヒドロゲナーゼ、牛乳β-ラクトグロブリン、鶏卵卵白リゾチーム、ウマ心臓ミオグロビン、およびウシ赤血球脱炭酸酵素（CA：カルボニックアンヒドラーゼ）は、Sigma-Aldrich, Inc.から購入しました。ウシ血清アルブミン（BSA）は、National Institute of Standards and Technology（NIST）から購入しました。ウサギ筋トリオースリン酸イソメラーゼは、Boehringer Mannheimから購入しました。凍結乾燥E.coli抽出タンパク質（カタログ番号：163-2110）およびバイオ・ラッド社で発現させた53 kD組換えタンパク質も利用しました。

タンパク質サンプルおよび混合物はいずれも、PBSで調製しました。凍結乾燥E.coli溶解産物は、再溶解して最終濃度を2 mg/mlとし、BSAは200 μg/mlの濃度に調製し、さらに、2.5～2,000 ng/μlのCA連続希釈液も使用しました。タンパク質の分子量測定と定量性の評価のために、9種類のタンパク質（β-ガラクトシダーゼ、ホスホリラーゼb、BSA、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、卵白アルブミン、乳酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、β-ラクトグロブリン、リゾチーム）の混合物を使用しました；乳酸デヒドロゲナーゼを0.1 mg/mlとした以外は、各々のタンパク質の最終濃度を0.4 mg/mlとしました。タンパク質ペアの分離では、分離の前に、各々のタンパク質調製品を同量で混合しました。

Experion Pro260分析

Experion Pro260分析キットには、タンパク質用分子量スタンダード、サンプルバッファー、ゲル溶液、蛍光染色液、スピンフィルター、電気泳動用チップが含まれています。各チップには、最大10種類のサンプルが入ります。これらのサンプルは、3.2% β-メルカプトエタノール入りのPro260サンプルバッファー2 μlを、4 μlのサンプルと混和し、95℃で5分間加熱してから、84 μlの蒸留水で希釈することにより調製しました。Pro260分析キットの取扱説明書に記載されているプロトコールに従って、チップにサンプルをアプライしました。各タイプの性能比較で、最低5個のチップ（ウェル数は25個以上）で泳動を行いました。感度検出のため、60～65秒間で観察されたノイズの標準偏差に対するピーク高の比率の100倍として、シグナル-ノイズ比（S/N比）を算定しました。

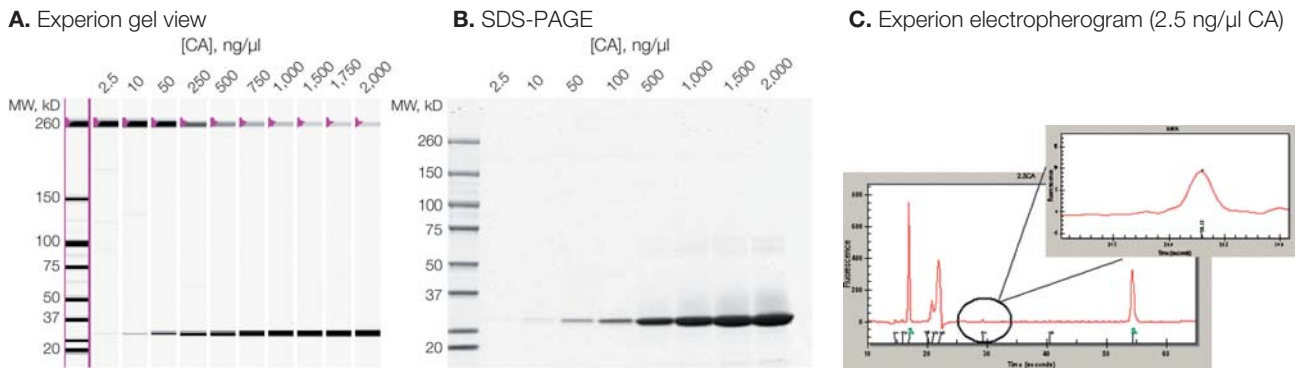



図1. ExperionシステムとSDS-PAGEによるCAの解析

指定濃度のCAサンプルを、Experion Pro260分析キット（A）と、4～20%のTris-HClゲルによるSDS-PAGE（B）を用いて分離しました。Cは、Experion電気泳動像で2.5 ng/μLのCA（総タンパク質量は10 ng）により生じたピークの拡大図です。この電気泳動像でCAのピークがベースラインから明確に分離していることに注目してください。この電気泳動像で認められるその他のピークは、左から右にかけて順に、1.2 kDのLowerマーカー、システムピーク（界面活性剤-色素複合体により生ずるもの）、および260 kDのUpperマーカーです。

SDS-PAGE

SDS-PAGEは、Criterionレディーゲル（Tris-HCl 4～20%T）と、Criterionセルを用いて行いました。4～20%Tグラジェントゲルは、得られる分離範囲がExperion Pro260チップと最も類似しているため、使用しました。サンプルは、ゲルにアプライする前に、5%β-メルカプトエタノールを含む4 μlの2xLaemmliサンプルバッファーを、4 μlのサンプルと混和し、95℃で5分間加熱することによって調製しました。電気泳動は、200Vの定電圧で55分間行いました。泳動後のゲルは、Bio-Safe CBBG-250ステインで1時間染色した後、蒸留水で一晩脱色し、GS-800デンシトメーターで画像を取り込み、Quantity One 1-D解析ソフトウェアで解析しました。比較において、ゲルごとに最低3回の反復実験（three replicates）とし、最低4枚のゲル（n≧12）で泳動を行いました。

結果および考察

感度および定量性

感度および定量性ダイナミックレンジを評価するために、CAについては2.5～2,000 ng/μlの範囲で10ポイントの希釈系列を作成し、各濃度で4 μlのサンプルを、Pro260チップおよびTris-HClゲルで解析しました。

Experionシステムで得られたバーチャルゲル画像では（図1A）、最も希釈倍率の高い希釈サンプル（2.5 ng/μl、総タンパク質量は10 ng）で認められるバンドが、Experionソフトウェアにより自動的に識別されました。実際には、このサンプルの電気泳動から、このタンパク質が平均SN比≧20でピークを生じていることが示されています（図1C）。これに対して、ゲル中で分離した場合、1-Dゲル解析ソフトウェアではこのサンプルに伴うバンドは検出されませんでした（図1B）。これらの結果から、Experion Pro260分析キットによる検出感度は、クマシーブルーで染色したSDS-PAGEゲルで得られるものと同等か、それ以上であることが示されます。

二つのシステムでの検出の定量性ダイナミックレンジについても比較しました。相対タンパク質濃度の代表的なプロット（Experionソフトウェアにより得られたもの）または相対バンド密度（Quantity Oneソフトウェアにより得られたもの）を、予想されるCA濃度と比較したところ（図2）、Pro260のデータポイントは、使用した全濃度範囲を通じて直線的であり、決定係数（r^2）が0.97～0.99の範囲であったことが示されています（n＝5チップ）。これに対して、4～20%Tris-HClゲルでは、r^2は0.96～0.97の範囲でした（n＝4ゲル）。ゲルデータの直線性を、Experionソフトウェアで得られたもの（r^2＝0.98前後）と同等にするには、検討するCAの濃度範囲を10～1,000 ng/μlに狭める必要がありました（データは省略）。

タンパク質分子量測定での正確性および再現性

タンパク質の分子量測定での正確性および再現性を比較するために、Experionタンパク質用分子量スタンダードを基準として推定された分子量について、ExperionとSDS-PAGEゲルでタンパク質の解析を行いました。Experionシステムでは、ソフトウェアから、Experionタンパク質用分子量スタンダードにおける各タンパク質の移動時間と既知の分子量（MW）に基づいて、検量線を作成しました。サンプルウェルでの各々のタンパク質の移動時間は、最初に、

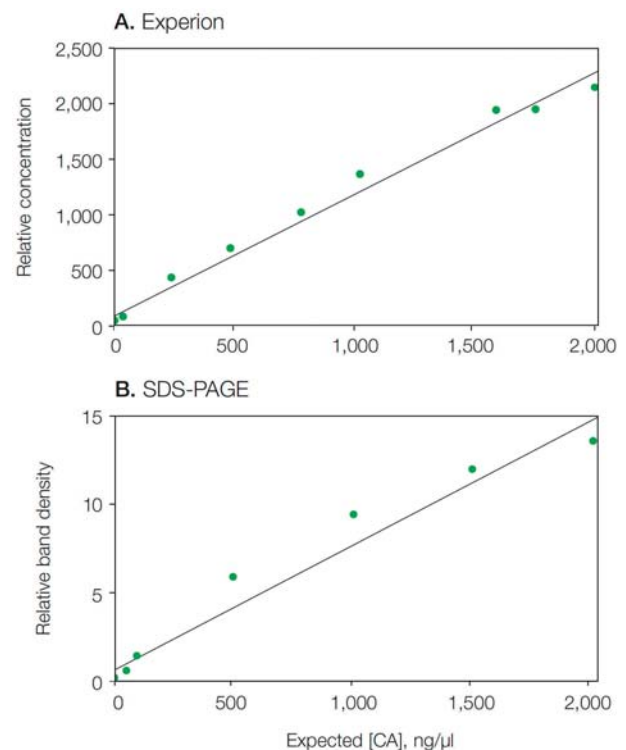



図2. タンパク質分離での定量性ダイナミックレンジの比較

Experion Pro260分析キットまたはSDS-PAGEにより分解した、指定濃度のCAサンプルを解析しました。Pro260（A）およびSDS-PAGE（B）解析により得られた相対濃度またはバンド密度を、濃度の関数としてプロットしました。代表的なグラフを示します。データセットの直線性適合のr^2値は、0.9887（A）および0.9626（B）でした。

表1:タンパク質混合物でのタンパク質の分子量決定の正確性*および再現性の比較**

タンパク質サンプルは、Experion Pro260分析キット(n=25)またはSDS-PAGE(n=25)を用いて分離しました。MW値は、平均±SDとして示しています。

		Experion			SDS-PAGE		
タンパク質	Expected MW (kD)	MW (kD)	Accuracy	Reproducibility	MW (kD)	Accuracy	Reproducibility
リゾチーム	14.3	14.23 ± 0.12	–0.49%	0.82%	12.10 ± 0.42	–15.38%	3.47%
β-ラクトグロブリン	18.4	18.82 ± 0.13	2.26%	0.69%	14.70 ± 0.50	–20.11%	3.40%
トリオースリン酸イソメラーゼ	26.6	26.10 ± 0.27	–1.86%	1.05%	24.00 ± 0.69	–9.77%	2.88%
乳酸デヒドロゲナーゼ	36.5	33.37 ± 0.29	–8.56%	0.86%	32.20 ± 1.00	–11.78%	3.11%
卵白アルブミン	45	44.43 ± 0.34	–1.26%	0.77%	42.30 ± 1.60	–6.00%	3.78%
グルタミン酸デヒドロゲナーゼ	55	56.32 ± 0.47	2.39%	0.84%	51.40 ± 1.37	–6.55%	2.67%
ウシ血清アルブミン	66	71.60 ± 0.70	8.49%	0.97%	66.70 ± 1.78	1.06%	2.67%
ホスホリラーゼb	97	95.44 ± 0.67	–1.61%	0.71%	96.20 ± 2.75	–0.82%	2.86%
β-ガラクトシダーゼ	116	123.00 ± 0.55	6.02%	0.45%	110.40 ± 3.06	–4.83%	2.77%

* 予測MWに対する相違率(%)として算定　**CVとして算定

各サンプルウェルとスタンダードウェル内に存在する内部Upperマーカー(260 kDa)とLowerマーカー(10 kDa)を用いて、分子量スタンダードに対して標準化しました。その後、分子量(Molecular Weight: MW)検量線を用いて、Experionソフトウェアにより、各サンプルタンパク質の分子量を求めました。SDS-PAGEゲルでは、分子量スタンダード中に存在する各タンパク質バンドについての相対移動度(R_f値)を用いて、標準曲線を描きました。これらの試験では、R_f値をExcelのスプレッドシートにエクスポートし、R_fに対する対数(MW)値をプロットすることによって、各ゲルでの分子量スタンダードの標準曲線を描きました。得られた式を用いて、検討対象となった混合物中での各タンパク質のMWを算定しました。分子量測定の再現性に関して、標準偏差/平均×100として変動係数(CV)を算定し、複数の測定間でCV値が小さいものほど良好な再現性を示すものとしました。分子量測定での正確性は、各タンパク質についてのMWの測定値と予測値の相違率を算定し、理論値と実測値間の値がゼロに近いものほど、同一であることを示すものとしました。

Pro260分析キット(CV≦1.05%)では、SDS-PAGE(CV≦3.78%)に比べて再現性の高い結果が得られました(表1)。さらに、Pro260分析キットで得られた分子量推定値は、より正確であり、予想分子量からのズレが-8.56〜8.49%であったのに対し、SDS-PAGEゲルでは-20.10〜1.10%のズレが認められました(表1)。

表1に示すデータからはさらに、4〜20%のSDS-PAGEゲルで分離された低分子量タンパク質では分子量測定の正確性が最低であったのに対し、Pro260解析キットによる分離では、分子量依存的な影響は認められなかったことも示されています。ただし、SDS-PAGEゲル分析では、特定の分子量範囲で最も正確な分子量測定を行うために、ゲル濃度を自由に選択できるというメリットがあるのも事実です。

表2. タンパク質定量における再現性*の比較

Experion Pro260解析キットまたはSDS-PAGEを用いて、タンパク質を分離しました。タンパク質濃度および密度の値は、平均±SEで示しています。

	Experion				SDS-PAGE			
Protein Sample	# of Wells	Conc. (ng/μl)	SD	Reproducibility	# of Lanes	Density	SD	Reproducibility
BSA	29	109.00	± 4.70	4.30%	12	1.11	± 0.09	8.41%
CA	30	161.00	± 17.00	11.00%	12	0.15	± 0.05	31.37%
Pro260 ladder								
10	29	157.10	± 21.00	13.00%	16	0.40	± 0.03	7.44%
20	29	182.30	± 19.00	11.00%	16	0.45	± 0.02	3.74%
25	29	160.70	± 26.00	16.00%	16	0.39	± 0.03	7.03%
37	29	110.10	± 9.00	8.00%	16	0.38	± 0.03	6.63%
50	29	119.90	± 12.00	10.00%	16	0.38	± 0.03	6.74%
75	29	127.10	± 11.00	9.00%	16	0.45	± 0.03	7.29%
100	29	105.00	± 5.00	5.00%	16	0.41	± 0.03	8.45%
150	29	67.00	± 2.00	3.00%	16	0.26	± 0.01	5.34%

* Calculated as % CV.

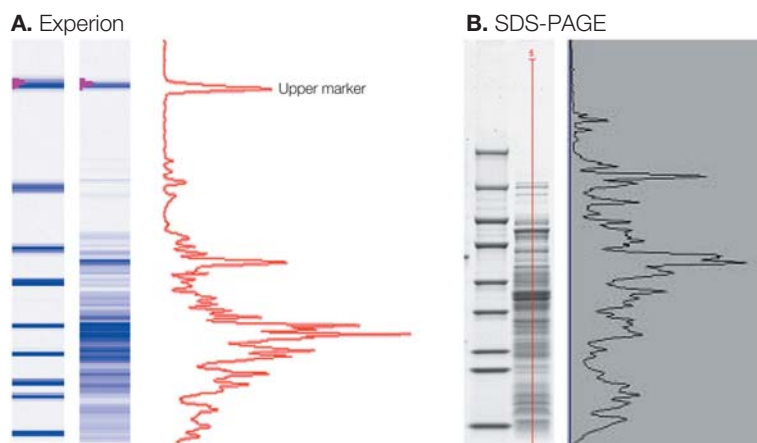



図3. E.coliタンパク質ライセートを用いたタンパク質検出の比較

Aは、Experion Pro260分析キットによるバーチャルゲル画像(左)および電気泳動像(右)。Upperマーカーで得られたピークを示します。Bは、SDS-PAGEによる分離のゲル画像(左)とQuantity Oneソフトウェアによる解析図(右)。二つの分離方法を用いた場合、同等数のピークが識別されました。

タンパク質定量での再現性

分子量測定に加えて、Experionシステムでは検出された各タンパク質の相対濃度を自動的に求めます。Pro260分析とSDS-PAGEで得られた定量性の再現性を示すために、Pro260チップと4〜20%のTris-HClゲルで、Experion タンパク質用分子量スタンダード、100 ng/μlのCAおよび100 ng/μlのBSAの3種類のタンパク質サンプルを分離しました。

ExperionおよびSDS-PAGEでの解析では、再現性がほぼ匹敵する定量結果が得られました(表2)。Pro260分析キットを用いた場合、検討対象となったタンパク質の定量でのCVの変動は3〜16%で、SDS-PAGEでの変動は3.7〜31.4%でした。最も大きな変動は、CAの染色が低かったことにより生じたものと考えられます。

表3. 解像度の比較

Experion Pro260分析キットまたはSDS-PAGEを用いて、タンパク質ペアを分離しました。

タンパク質	Expected MW (kD)	Observed MW (kD)		Expected Difference	Observed Difference	
		Experion	SDS-PAGE		Experion	SDS-PAGE
A Experionタンパク質用分子量スタンダード（100 KDa） ホスホリラーゼb	100 97	100.11 96.15	97.2 92.1	3.09%	4.12%	5.54%
B Experionタンパク質用分子量スタンダード（75 KDa） BSA	75 66	74.78 71.80	74.8 64.2	13.60%	4.15%	16.51%
C 組換えタンパク質 Experionタンパク質用分子量スタンダード（50 KDa）	53 50	52.50 50.09	50.8 50.8	6.0%	4.81%	0%
D Experionタンパク質用分子量スタンダード（37 KDa） 乳酸デヒドロゲナーゼ	37 36.5	37.23 33.59	35.9 31.0	1.37%	10.84%	15.81%
E トリオースリン酸イソメラーゼ Experionタンパク質用分子量スタンダード（25 KDa）	26.5 25	26.50 24.91	22.7 22.0	6.40%	6.38%	3.18%
F β-ラクトグロブリン ミオグロビン	18.4 17	19.07 16.97	14.5 14.5	8.24%	12.37%	0%

解像度

Experion Pro260分析キットは、解像度が、4～20%のTris-HClゲルで得られるものと同等かそれ以上となるようにデザインされています。この同等性を示すために、二つの方法を用いてE.coliタンパク質ライセートを解析し、各方法で検出された異なるタンパク質ピークまたはバンドの数を比較しました。Pro260分析キットでは、初期設定で平均35種類のタンパク質ピークが高い再現性で分離または同定されたのに対し、ゲルを用いた分離では、Quantity Oneソフトウェアのバンドプロット機能を用いて、平均33種類のピークが検出されました（ノイズフィルター設定＝4.0、ショルダー感度＝1.0）（図3）。

解像度は、解像値（R_S）を用いて記述することもでき、これは、数式の$R_S = 1.17 \times (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$で定義され、ここで、$t_1$＝ピーク1の移動時間、$t_2$＝ピーク2の移動時間、w1＝ピーク1の半分の高さでの幅、w_2＝ピーク2の半分の高さでの幅です。R_Sは、クロマトグラフィーまたはその他の分離システムが二つの分子をどの程度、解像または分離しているかを示すものです。この式からは、二つの分子が類似した形態のピークを生じていることが推測されます。$R_S \geqq 1.5$というのは、システムが二つの分子種を完全に分離し（ベースラインでの分離）、最初のピークからのピークシグナルは、二つ目のピークのシグナルが増大する前に、ベースラインに戻っていることを意味するものです。

Experionシステムを用いたPro260ラダーでの反復分離に基づき、MWが10%程度異なる類似タンパク質について、R_Sの算定を行いました。これらのR_S値は分子量が増加するにつれて増大し、10 kDでの$R_S = 1.2$から、260kDでは$R_S = 2.0$となりました（データは省略）。このことから、25kDを上回り（$R_S = 1.5$）、分子量が10%程度異なるタンパク質では、Pro260アッセイにより異なるピークとして分離することできました。実際には、ソフトウェアによりピークを解像する場合には、二つのタンパク質のベースラインを検出したりマークしたりする必要はありません。そのため、MWの相違率がわずかなタンパク質も、視認することができます。

Pro260分析キットと従来のSDS-PAGEの解像能をさらに検討するため、MWが1～13%異なる既知分子量のタンパク質のペアを含有する複数のサンプルについて、解析を行いました。多くの場合、二つの方法ではタンパク質ペアが異なるピークまたはバンドとして解像されましたが（表3および図4、対A、B、DおよびE）、一部の例では、チップによる分離のほうが、ゲルに比べて極めて良好な解像度を示しました（表3および図4、対CおよびF）。

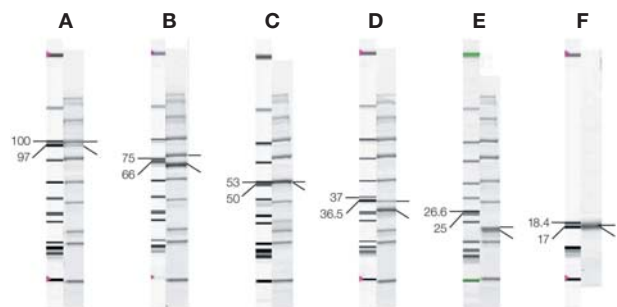



図4. Experion Pro260分析キットおよびSDS-PAGEによるタンパク質ペアの分離の比較

表3に示した各々のタンパク質ペアについて、左パネルはExperionでのバーチャルゲル画像を示し、右パネルはSDS-PAGEゲル画像のスキャン図を示します。

結　論

Experion Pro260分析キットの性能は、感度、定量性ダイナミックレンジ、タンパク質分子量測定での再現性および正確性、定量の再現性および、全般的な解像度が、4～20%のグラジェントTris-HClゲルを用いたSDS-PAGEと同等かそれ以上となっています。SDS-PAGEでは最終的な結果を得るために何時間も要しますが、ExperionシステムとPro260分析キットでは最大10種類までのタンパク質サンプルの分析結果が、わずか30分で得られます。ExperionシステムとPro260分析キットを用いることで、迅速かつ良好な解像度と高い再現性の結果が得られ、品質管理、タンパク質純度および安定性の解析、プロトコールの最適化、ならびに、組換えタンパク質の発現評価などの目的を満たすことができます。

本記事の追加コピーについては、テクニカルグレティン5299をご請求ください。

IMAC Profinity™：リコンビナントHis-tagタンパク質精製のための最適な支援

Danni Wang, Xuemei He, Shane Petersen, Fang Fang Wu, Yueping Xu, Tanis Correa, and Hong Chen 6000 James Watson Drive, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547 USA

はじめに

固定化金属アフィニティクロマトグラフィー（IMAC）は、主に様々な発現システムからのリコンビナントHis-tagタンパク質の効率的な精製に用いられている、有用な手法です。
IMAC担体の合成は、適当なポアサイズを持ち、イミノ二酢酸（IDA）またはニトリロ三酢酸（NTA）など、リガンドとなる金属キレート基を結合させた担体の誘導体化から開始します。その後、通常はCu^{2+}、Ni^{2+}、Co^{2+}、Ca^{2+}またはZn^{2+}などの遷移金属イオンがリガンドと錯体を形成し、固定化金属アフィニティの支持体となります。IMAC担体は金属イオンがチャージされた状態で、ヒスチジン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸などが豊富なタンパク質と同様、リコンビナントHis-tagタンパク質に対しても高い親和性を示します。
IMAC Profinityは、バイオ・ラッドが独自開発したUNO sphereマトリクスを使用し、IDAの誘導体化によって得られた約60 μmの粒子です。物理的的強度と優れた耐圧性を有し、結合能、回収率またはターゲットタンパク質の最終的な純度を損なうことなく、高流速でタンパク質を分離することができます。リガンド密度は非特異的な結合が低下するように最適化しました。さらにオープンポア構造をしており、幅広い分子量のタンパク質の精製、特に大きなタンパク質の精製にも対応することができます。

表1. リコンビナントHis-tagタンパク質精製の評価に使用した担体およびタンパク質サンプル

Materials	Properties
タンパク質サンプル	以下のうちのいずれか一つを含有する大腸菌破砕液： • Anabaena sp. PCC7120株に由来する32 kDのHis-tagタンパク質* • $(His)_6$-GFP • 250 kDのリコンビナントHis-tagタンパク質 • 75 kDのリコンビナントHis-tagタンパク質 精製したHis-tag NIF-3
担体	IMAC Profinity担体（IDA担体） A社のIMAC担体 • 担体1、アガロースをベースとする未チャージ担体（IDAリガンド）、使用前にNi^{2+}をチャージ • 担体2、アガロースをベースとする、Niでチャージした高結合能担体（IDAリガンド） • 担体3、アガロースをベースとする、Niでチャージした新しい高結合能担体（IDAリガンド） B社のIMAC担体（NTAリガンド） C社のIMAC担体（N-カルボキシメチルアスパラギン酸リガンド）

* カリフォルニア州立大学（米国・カリフォルニア州バークレイ）のRay Stevens博士より寄贈

Method

クロマトグラフィーシステムおよび試薬

液体クロマトグラフィーシステム

すべての圧ー流速および動的結合量のテストは、BioLogic DuoFlowシステムまたはBioLogic DuoFlow Maximizer（最大流速80 ml/min）システムを使用しました。圧センサーの正確度は、外部圧ゲージ（PG-2000デジタル圧ゲージ、PSI-Tronix, Inc.）を用いて確認しました。システム圧を軽減するために、高圧Teflon FEPチューブ（外径3.2 mm、内径1.6 mm）を使用しました。

担体

IMAC Profinityおよび他メーカーのIMAC担体（金属イオン未チャージ製品含）を用いました（表1）。

タンパク質サンプル

分子量、溶解度および入手のしやすさを考慮し、いくつかのリコンビナントHis-tagタンパク質を用いました（表1）。

カラム

圧ー流量テスト、最大圧テストおよび膨縮テストでは、1.1×30 cmのAmiconカラムを用いました。担体に対する動的結合量テストは、Bio-Scale MT2カラムとGE Healthcare HR 5/5カラムを用いました。
バッチ結合試験では、IMAC担体を充填したMicro Bio-Spinスピンカラムを用いて、ベンチトップ型遠心分離機での1,000 gの溶出で、選択性を検討しました。

緩衝液

IMAC担体の性能は、個々の実験で詳述されているように、クロマトグラフィーによる未変性タンパク質精製および変性タンパク質精製で使用されている一般的な緩衝液を用いて比較しました。His-tagタンパク質の溶出に使用した緩衝液には、金属結合部位でヒスチジンと選択的に競合するイミダゾールを利用しました。
SBS Medel DV-100粘度計（Stony Brook Scientific, Ltd.）を用いて、カラム性能試験で使用した緩衝液またはその他の溶液の粘度を求めました。

クロマトグラフィーの性質の検討

カラムの充填

IMAC担体はすべて、20 mMのリン酸ナトリウム緩衝液中で50%（v/v）のスラリーにし、カラムは、20 mMのリン酸緩衝液流液下で、ベッド高が約20 cmとなるように充填しました（最大43 psi（3 bar））。フローパッキング後、カラムアダプターを装着、

D.

溶液	Viscosity (cP)	Maximum Flow Rate at 43 psi (cm/hr)		
		Profinity IMAC	Supplier A, Resin 1	Supplier B Resin
◆ 20 mMリン酸ナトリウム	1.066	900	970	750
■ 1 M NaOH	1.623	780	828	560
▲ 6 M 塩酸グアニジン	1.821	610	590	370
● 8 M 尿素	2.062	550	530	250

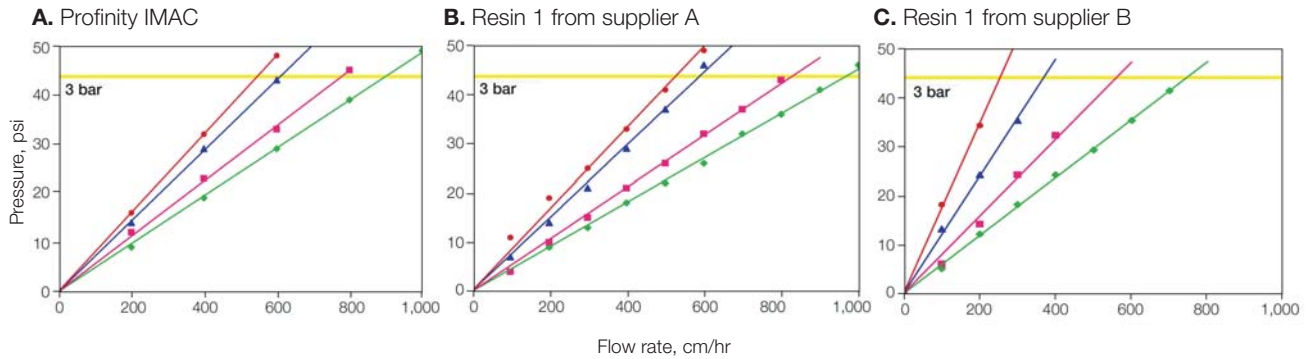



図1. IMAC担体の圧－流量曲線の比較
流量は、100または200 cm／hずつ段階的に増大させ、2分間維持しました。A～Cは、圧-流量曲線、Dは、各々の溶液の粘度と、評価対象となった各担体に関する43 psi（3 bar）での流量。

ベッドをさらに圧縮しました。他の緩衝液を用いるテストでは、テストの前に、カラム容積（CV）の3倍量のこれらの緩衝液を用いてカラムを平衡化しました。

耐圧テスト

本レポートでの耐圧性データは、いずれもベッド高が20 cmのカラムの値と比例させて算出しました。圧−流量テスト、実際にベッドにかかる圧力、および膨縮テストの実施により、クロマトグラフィーの適用に関連する3種類の担体の性質を検討しました。圧−流速テストでは、通常の操作条件内（圧≦43 psi、流量≦1,200 cm／時）で、種々の緩衝液について、流量とカラム圧との相関関係を測定しています（図1）。粘度の異なる緩衝液またはその他の溶液を使用しました。各々の流量での圧力は、圧が43 psiを上回るまで、記録しました。

カラムベッドにかかる圧力は、流量を次第に増大させることによって評価し、圧力が急激に変化し、カラムベッドが著しく圧縮、損傷、破壊されたりする時点を最大耐圧とします。各々の流量での圧力は、圧力が急激な変化を示すか、または、500 psiを上回るまで記録しました。そして、最大耐圧を圧−流量曲線に対する二つの接線の交差点と定義しました（図2）。

膨縮テストでは、流量を増大させた場合の種々の緩衝液におけるカラムベッド高の変化を測定します。各々の流量でのカラムベッド高および圧力を記録しました（図3）。

その他の物理的性質

繰返し使用での安定性、線流速に対するタンパク質溶出時の挙動、および動的結合能など、IMAC Profinity担体の他の性質を評価するために、追加試験を行いました。

サイクル安定性を評価するためには、IMAC Profinityを充填した1 mlのHR5/5カラムにおいて、201サイクル行いました（図4）。

線流速に対する溶出の挙動を評価するために、組換え75kD His-tagタンパク質を含有する大腸菌破砕溶液を1 mlのカラムにアプライし、さまざまな流量でのサンプルアプライ・平衡化・溶出のサイクルをテストしました（図5）。

動的結合能は、既知濃度のサンプルをカラムに連続的にローディングし、フロースルーでのタンパク質をモニタリングすることにより求めました（図6）。フロースルーでのタンパク質量が10%（Q10%または10%ブレークスルー）を上回った場合、サンプルのアプライを中止し、アプライしたタンパク質量を算定しました。

電気泳動およびタンパク質の定量

種々のHis-tagタンパク質に対するIMAC Profinityおよびその他のIMAC担体の動的結合能と、標的タンパク質の収量および純度は、UV-可視光分光光度法およびSAS-PAGEによるクロマト分画の解析によって、評価しました。SDS-PAGE解析では標準化したタンパク質を用い、Criterion Tris-HClゲルを用いて行いました。ゲルは、クーマシーブルーで染色し、Quantity Oneソフトウェアを用いて解析し、個々のタンパク質バンドの純度を求めました（図7、8）。

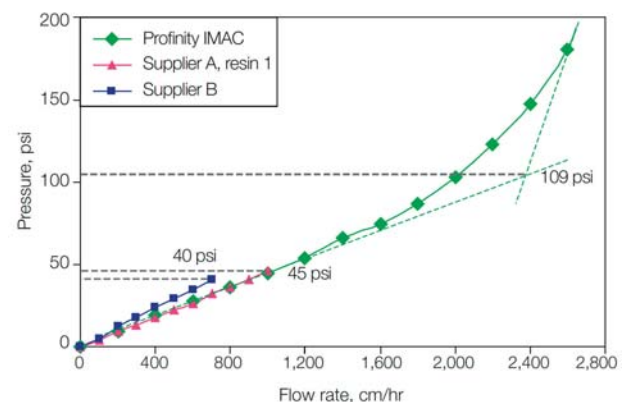



図2. 種々のIMAC担体の耐圧性の比較
示されている圧力値は、各担体の最大耐圧です。担体は、20 mMのリン酸ナトリウム緩衝液中で50%（v/v）のスラリーにし、最大43 psi（3 bar）でベッド高が20 cmとなるように、1.1×30cmのAmiconカラムに充填しました。その後、流量を200 cm／hずつ段階的に増大させて、各段階で2分間維持しました。IMAC Profinity担体の圧-流量曲線は、109 psi（7.5 bar）を上回る圧力で初めて非直線的となり、最大耐圧は、圧-流量曲線の二つの接線の交差点として定義しました。

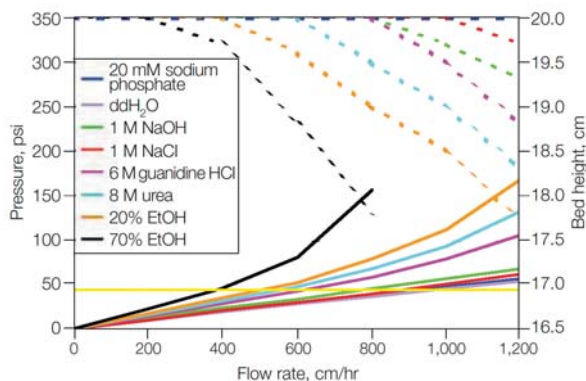



図3. IMAC Profinity担体での膨縮テスト

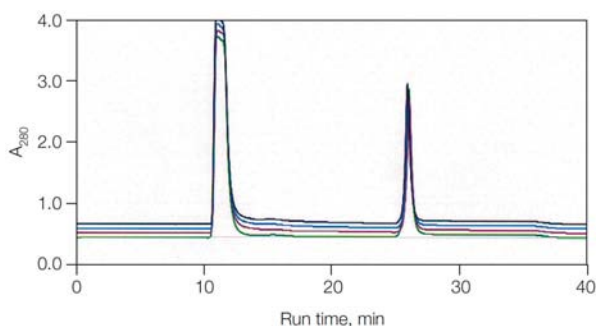
20 cmのベッド高でIMAC Profinityを充填した1.1×30cmのAmiconカラムに、His-tagタンパク質精製で使用されている一般的な溶液を流しました。各流量で、システム圧とカラムベッド高の比較を記録しました。流量は、200 cm／hまで段階的に増大させ、各々の段階で2分間維持しました。黄色い水平線は、43 psi（3 bar）を示します。

ストリッピング	50 mM EDTA、50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl（pH 7.5）
洗浄	50 mM 酢酸ナトリウム、300 mM NaCl（pH 4.0）
洗浄	100 mM NiSO4（pH 4.0）
洗浄	50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl（pH 8.0）
清浄化	1.0 N NaOH（サンプル注入前はこの手順をスキップ）

図4. サイクル検査のBioLogic DuoFlowの重ね合わせ報告

IMAC Profinityを充填した1 mlのカラムを、201サイクルにわたって使用しました。サイクル1と、記述されているステップからなる50回の洗浄サイクルの各間隔後、サンプル（75 kDのHis-tagタンパク質を3.51mg含有する250μlの大腸菌破砕液）をカラムにロードしました。

Results and Conclusion

IMAC担体の物理的性能

最高43 barで20 cmの担体をカラムに充填し、アダプター装着によりさらに圧縮しました。これにより、IMAC Profinityカラムベッドはさらに10 mm（5%）圧縮されました。これとは対照的に、A社のIMAC担体1および、B社から得られたIMAC担体は、さらに1 mmしか圧縮されませんでした。

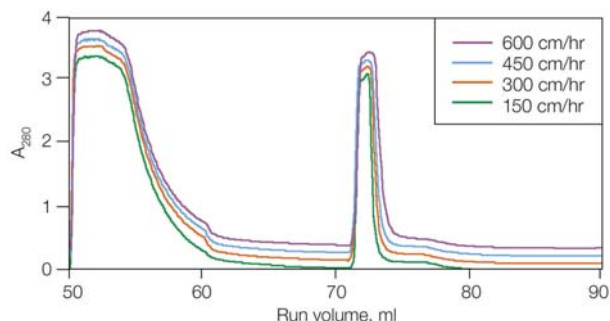



図5. 異なる流量でのIMAC Profinityの結合能と選択性の一貫性

発現させた75 kDのHis-tagタンパク質を含有するE.coliの大腸菌破砕液を、事前に50 mM リン酸カリウムと0.3 M NaCl、pH 8.0）で平衡化した1 mlのカラムにロードしました。タンパク質は、上記緩衝液に500 mM イミダゾール添加した緩衝液で溶出しました。溶出は、280 nmでモニタリングしました。

圧-流量実験では、同一カラムでの異なる実験、および、同一担体を用いた異なるカラムでの実験で、実験誤差は、±5 psi以内で類似した結果が得られました（図1）。IMAC Profinityの圧-流量曲線からは、望ましい浅い傾きが示され、A社の担体1でも、粒子サイズが大きい（当製品の60 μmに対して、90 μm）にもかかわらず同様の結果が示されました。B社のIMAC担体での圧-流量曲線は、傾きがかなり急なものでした。IMAC Profinityは、43 barを下回る場合でも高直線性流量を示し、これは、適切な流量であれば、比較的粘度の高い緩衝液でも、分離が行われることを意味します。これらの値は、A社の担体1についても類似しており、B社のIMAC担体に比べてかなり良好となっています。

耐圧性テストの結果を、図2に示します。IMAC Profinityの最大耐圧は、流量が2,400cm/時で100 psi以上でした。この値は、A社およびBのIMAC担体で認められたものに比べて、かなり高いものでした。A社の担体1およびB社のIMAC担体はどちらも、アガロースをベースとするゲルタイプの素材であり、正味最大稼動圧は<50 psiでした。IMAC Profinity担体は、高度に架橋されたポリマーから成っています。この担体の圧-流量曲線の非直線的な部分は、高圧領域であり、他の担体に比べて高圧力（43～100 psi）で安定であることが示されました。

IMAC Profinityの膨縮テストの結果を図3に示します。エタノール-水混合液では、カラムベッドの収縮が最大となりました。これとは対照的に、20 mMのリン酸ナトリウム、脱イオン水および1MのNaClでは、有意な収縮は生じませんでした。検討対象となった溶液を収縮作用が大きかった順番に並べると、1M NaOH、6 M塩酸グアニジン>8 M尿素>20%エタノール>70%エタノールの順になりました。

繰返し使用のサイクル後、IMAC Profinity担体は、通常の緩衝液条件および酸（pH 4.0）・アルカリ（1N NaOH）処理後も一定で再現性のある分離を示しました（図4）。

IMAC Profinityによる線流速に対するタンパク質溶出時の挙動に関するテストの結果、使用した流量に関わらず、標的タンパク質が同数の分画で溶出されたことが示されました（図5）。

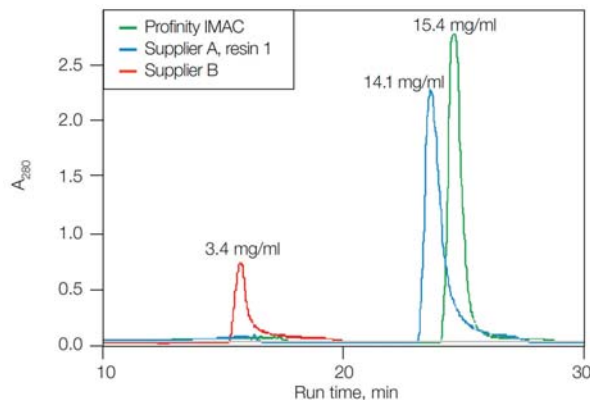



図6. 未変性条件下での種々のIMAC担体の動的結合量

10%のブレークスルーが生ずるまで、同一のサンプルをアプライしました。各カラムを洗浄し、His-tagタンパク質を溶出させて、結合量を算定しました（各ピークの上部に記載。溶出プロファイルのクロマトグラムは、重ね合わせてあります）。

600 cm／時でのretention timeは、カラムを150 cm／時で稼動した場合に得られた結果と同等でした（それぞれ、20.3および21.8 mg/ml）。さらに、クロマトグラムはほぼ完全に重ねあわせることができ、このことから、IMAC Profinity担体は高い線流速にも対応できることが分かりました。この担体の流量での性質およびオープンポア構造によるもので、これは、種々の流量で結合能や回収率を損なうことのないHis-tagタンパク質の精製によって、十分に検討されています。

動的結合能の結果を、図6に示します。IMAC Profinityに結合した標的タンパク質の量は、A社の担体1に結合したものに比べてわずかに多く、B社の担体に結合したものに比べてかなり多いものでした。

His-tagタンパク質の収量および純度

IMAC担体で分離した後のHis-tagタンパク質の純度の高さは、担体を選ぶ際に最も重要視されるものです。これは、最適なリガンド密度によって実現します。IMAC Profinityは、通常タンパク質を構成しているヒスチジン残基より、リコンビナントHis-tagタンパク質のtagに対して特に選択的なものとなっています。この選択性が高いため、他のIMAC担体を使用した場合に比べて、標的タンパク質の純度が高くなるのです（図7）。

また、250 kDのタンパク質に対する動的結合能の比較から示されるように（図8）、IMAC Profinityのオープンポア構造は大きなサイズのHis-tagタンパク質の精製にも適していることが分かります。

結　論

- **Ni^{2+}イオンでチャージした場合、IMAC Profinity担体はリコンビナントHis-tagタンパク質に対して高い選択性を示しました。**
- **IMAC Profinity担体を充填したカラムは、変性剤を使用した場合にも緩衝液粘度の増大によって生ずる高い圧力に耐えました。**
- **200 サイクル以上の利用にわたって、優れた再現性を示しました。**
- **最大600 cm/hの線流速でもretention timeに変化はありませんでした。**
- **タンパク質の精製に使用されている一般的な界面活性剤や還元剤に適合し、きわめて広い範囲のpHで安定でした。**

以上のことより、IMAC Profinity担体は再現性良く、効率的なリコンビナントHis-tagタンパク質精製を可能にします。装置を用いたクロマトグラフィー、自然落下方式、スピンカラムを用いての、未変性条件および変性条件下での種々の発現システムからのHis-tagタンパク質の分離・精製にも使用できます。また、これらの特性は既存のIMAC担体を上回る優れた性能を示すことが分かりました。

A

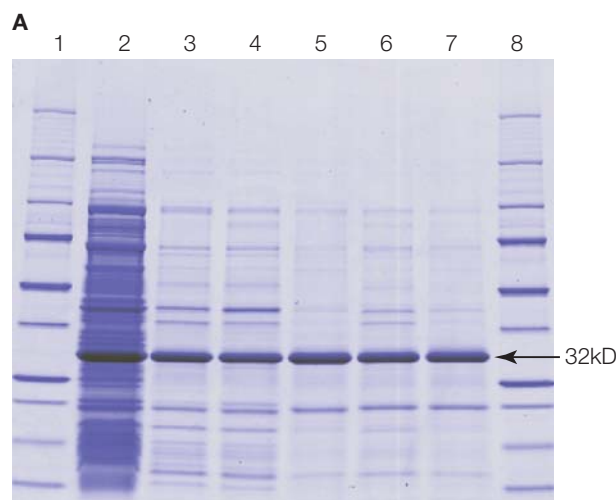
B

Resin	Yield	Purity
Profinity IMAC	4.3 mg	93%
Resin 2, supplier A	6.3 mg	81%
Resin 1, supplier A	4.0 mg	78%
Supplier B	2.9 mg	89%
Supplier C	2.8 mg	92%

図7. Niチャージした種々のIMAC担体を用いた、未変性条件下での不溶性32 kD His-tagタンパク質の精製

His-tag Anabaena由来タンパク質を発現している大腸菌破砕液を50 mM リン酸ナトリウム、0.3 M NaCl、8 M 尿素、pH 8.0で平衡化したIMAC担体を含有するMicro Bio-Spinカラムにアプライしました。His-tagタンパク質は、同様の緩衝液に250 mM イミダゾールを添加した緩衝液で溶出しました。Aは、3 μgの粗溶解産物または溶出されたタンパク質を、SDS-PAGEで分離したもの。レーン1と8は、10 μlのPrecision Plus Proteinスタンダード、レーン2は、大腸菌破砕液、レーン3は、A社の担体2、レーン4は、A社の担体1、レーン5は、IMAC Profinity担体、レーン6は、B社の担体、レーン7は、C社の担体。Bは、溶出されたHis-tagタンパク質の算定収量と純度。

A

B

C

Resin	Yield	Purity
Profinity IMAC	3.6 mg	86%
Supplier A	2.1 mg	36%
Supplier B	1.1 mg	20%

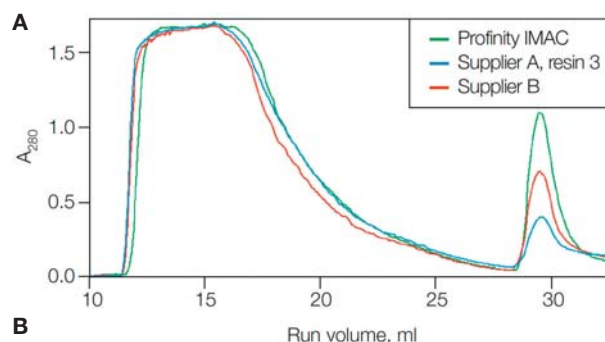



図8. 種々のIMAC担体での250kDのHis-tagタンパク質の精製

Aは、重ね合わせたクロマトグラム。タンパク質を発現している大腸菌破砕液を、CVの5倍量の緩衝液（50 mM KH2PO4、0.3 M KCl、10% グリセロール、6 M 尿素、pH 8.0）＋5 mMイミダゾールで平衡化した1 mlの担体を含有するBio-Scaleカラムに、0.2 ml／minでアプライしました。カラムを再度平衡化し（CVの6倍量）、CVの7倍量の緩衝液＋10 mM イミダゾールで洗浄してから、CVの6倍量の緩衝液＋250 mM イミダゾールで1 ml／分で溶出しました。Bは、溶出したHis-tagタンパク質を含有するプール脱塩分画のSDS-PAGE。レーン1は、Precision Plus Proteinスタンダード、レーン2は、大腸菌破砕液、レーン3〜5は、IMAC Profinity、A社の担体3、B社の担体で溶出したもの。Cは、溶出されたHis-tagタンパク質の算定収量と純度。

蛍光染色剤Flamingo™ ゲルステインによるタンパク質の検出と定量

Tom Berkelman

はじめに

タンパク質の検出および定量では、ある色素が非特異的にタンパク質に結合し、それに伴って色素のスペクトルが変化する、という性質を利用するのが一般的です。このような特性をもつ蛍光色素は、検出感度が高く、蛍光により得られるダイナミックレンジが広いため、タンパク質の解析に特に有用なものとされています。現在のプロテオミクス解析には、RUBYゲルステインのような蛍光ゲル染色剤をはじめ、蛍光色素が広く用いられています。

蛍光染色剤Flamingoゲルステインは、変性タンパク質の存在下で、著しい蛍光強度の増加を示します。本製品の有用性を検証するため、ゲルを染色後、異なる方法で検出した際の感度比較、タンパク質量と蛍光強度の相関性について評価しました。また、FlamingoゲルステインおよびRUBYゲルステイン間で、検出感度および質量分析を用いた同定結果の比較を行いました。

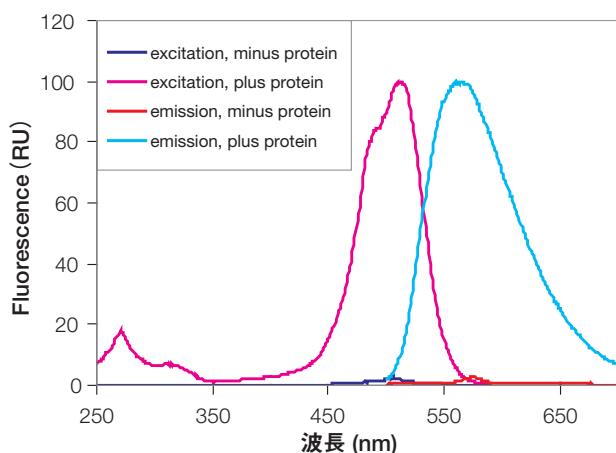
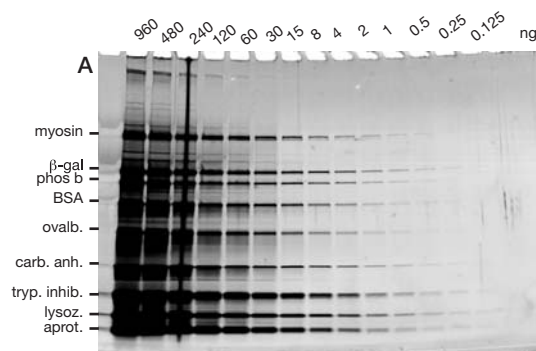
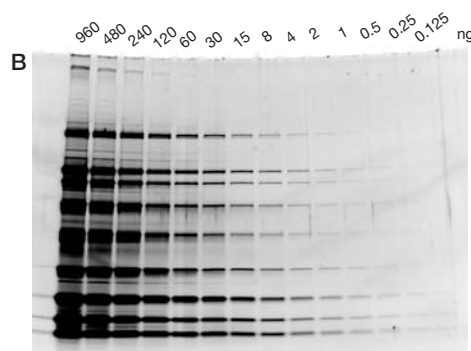



図1. タンパク質の存在下および非存在下でのFlamingoゲルステインの蛍光スペクトル

50 mMのギ酸ナトリウム（pH 4.0）中に、100 μg/mlのチキントリプシンインヒビター存在下および非存在下で、165 nMのFlamingoゲルステインを加えて蛍光を測定しました。8 M尿素溶液に溶解した10 mg/mlのトリプシンインヒビターを100倍希釈となるように添加しました。励起波長と蛍光波長はそれぞれ、480 nmおよび610 nmを示しました。

結　果

Flamingoゲルステインの蛍光は、タンパク質の非存在下ではほとんど検出されず、100 μg/mlのタンパク質存在下で著しく蛍光強度の増加を示しました（図1）。

Flamingoゲルステインの蛍光強度は、タンパク質4～80 μg/mlの濃度範囲で、高い直線性を示しました（図2）。

Flamingoゲルステインは、532 nmのレーザー励起光を用いた場合0.25 ngまで、300 nmのUVトランスイルミネーターを用いた場合0.5 ngまで、タンパク質を検出することが可能でした（図3）。

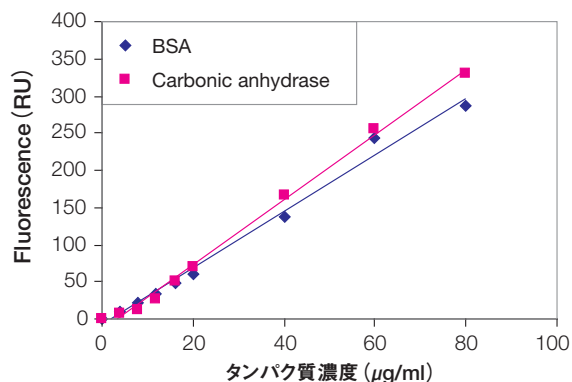



図2. 溶液中におけるタンパク質の定量性

50 mMのギ酸ナトリウム（pH 4.0）中に、尿素で変性させた各濃度のウシ血清アルブミン（BSA）およびウシ炭酸脱水酵素（CA）を用意し、165 nMのFlamingoゲルステインを加えて蛍光を測定しました（励起波長510 nm、蛍光波長540 nm）。各々のタンパク質濃度は、2回の測定値の平均値を示しています。

表1. Flamingoゲルステインのプロトコール

ステップ	試薬	容量*	時間
固定	40% エタノール 10% 酢酸	200 ml	2時間以上
染色	Flamingo染色液	100 ml	3時間以上**
（オプション） 脱色	0.1% (w/v) Tween 20	200 ml	10分***

* 容量は、13×9 cmのゲルを染色するために必要な量です。

** 3時間以内に、最適な染色感度に達します。直線的な定量性を得るためには、長時間（8時間からオーバーナイト）の染色が必要です。

*** 通常、Flamingoゲルステインで染色したゲルは脱色不要です。脱色のステップにより、バックグランドがある程度、低下します。

図3. 2種類の蛍光検出法による、Flamingoゲルステインを用いたタンパク質の検出感度

バイオ・ラッド社製SDS-PAGEスタンダードの希釈系列（0.125～980 ng）を、Criterionレディーゲル（4-20%, Tris-HCl）で電気泳動後、Flamingoゲルステインで染色しました。ゲル画像は、濃度の低いバンドが可視化できるまで画像処理しました。

A：Molecular Imager FXシステムによるゲル画像（Excitation 532 nmレーザー、Emission 555 nm longpassフィルター）

B：VersaDoc 4000を用いた、300 nm UVトランスイルミネーターによるゲル画像（5分間露光）

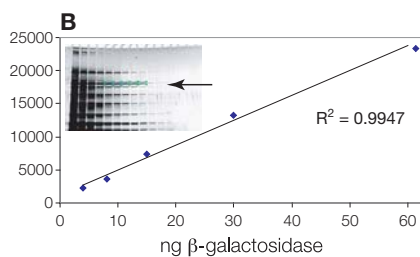
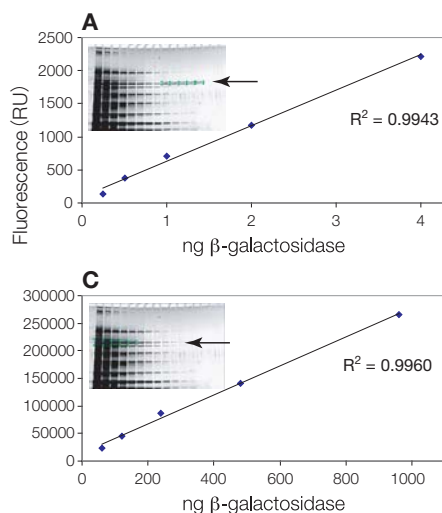
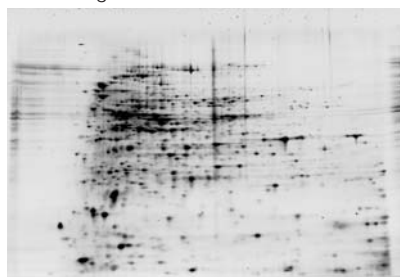
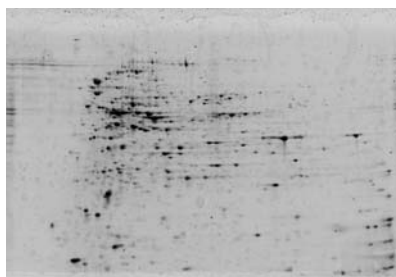



図4. Flamingoゲルステインのダイナミックレンジ

バイオ・ラッド製SDS-PAGEスタンダードの希釈系列を、Criterionレディーゲル（4-20%、Tris-HCl）で電気泳動後、Flamingoゲルステインで染色しました。染色後、Molecular Imager FXシステムを用いて、ゲルイメージの検出と取り込みを行いました。各濃度のβ-ガラクトシダーゼに由来する蛍光値は、Quantity Oneソフトウェアを用いてバックグランドを除去した後、定量しました。

A：0.25～4 ng、**B**：4～60 ng、**C**：60～960 ng。グラフに表記したゲル画像と矢印は、定量する際に選択したβ-ガラクトシダーゼのバンドを示します。

Flamingoゲルステインで染色後の蛍光値は、検出限界の0.25 ngから約1 μgまで、タンパク質量と比例して、直線的に増加しました（図4）。

Flamingoゲルステインは、2次元電気泳動で分離したタンパク質（E.coliライセート）をRUBYゲルステイン以上の感度で検出することが可能でした（図5）。

Flamingoゲルステインで染色した2-Dゲルからタンパク質を切り出し、トリプシン処理したペプチドをMALDI解析した結果、RUBYゲルステインで染色した場合に比べ、多くのペプチドにヒットしました（図6）。

A Flamingo ゲルステイン

B RUBY ゲルステイン

図5. FlamingoゲルステインおよびRUBYゲルステインで染色した2-Dゲルの感度比較

E.coli粗抽出サンプル（10 μg）を、2-D電気泳動を用いて分離しました。1次元目の分離はReadyStrip IPGストリップ（11 cm, pH 3-10 NL）、2次元目の分離はCriterionレディーゲル（8-16%、Tris-HCl）を用いて行いました。分離したゲルは、Flamingoゲルステイン、およびRUBYゲルステインで各々染色しました。染色後のゲルは、Molecular Imager FXシステムで検出しました（Excitation 532 nmレーザー、Emission 555 nm longpassフィルター）。ゲル画像は、濃度の低いスポットが可視化できるまで画像処理しました。

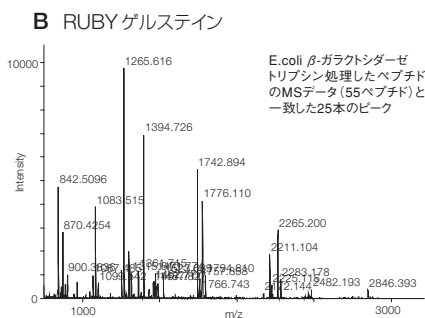
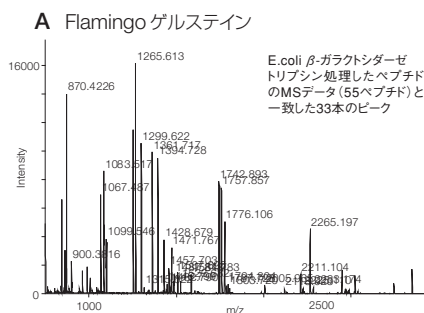
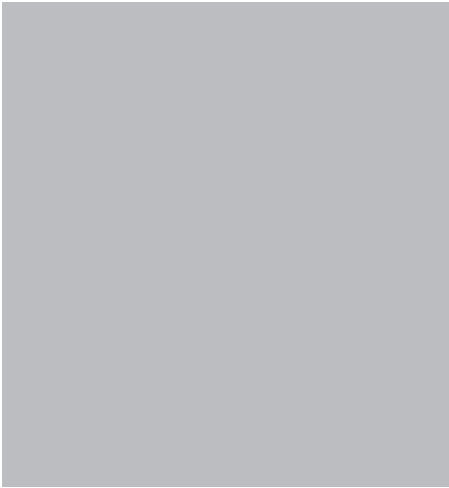
A Flamingo ゲルステイン

B RUBY ゲルステイン

図6. 染色したゲルから切り出したタンパク質のMALDIによる同定結果

約24ngのE.coli β-ガラクトシダーゼを、FlamingoゲルステインおよびRUBYゲルステインでそれぞれ染色後、トリプシン処理したペプチドをMALDIで同定しました（Proteome Research Services, Ann Arbor, MI）。

結　論

- **Flamingoゲルステインは、タンパク質の存在下で著しい蛍光の増大を示します。**
- **Flamingoゲルステインの蛍光は、タンパク質濃度と直線的に相関し、溶液中のタンパク質の定量に利用することが可能です。**
- **Flamingoゲルステインは、2ステップ、約5時間の簡単なプロトコールで、SDS-PAGEゲルの染色に使用することが可能です。**
- **Flamingoゲルステインは、532 nmのレーザーで励起させた場合、0.25 ng以上のタンパク質を検出することが可能です。**
- **Flamingoゲルステインは、300 nm UVトランスイルミネーターで励起させた場合、0.5 ng以上のタンパク質を検出することが可能です。**
- **Flamingoゲルステインで染色したタンパク質は、3オーダーの直線性を示し（0.25～960 ng）、ゲルで分離したタンパク質を定量することが可能です。**
- **Flamingoゲルステインは、2-Dゲルの解析にも使用することが可能で、RUBYゲルステインより高感度に検出することが可能です。**
- **Flamingoゲルステインは、トリプシン処理したペプチドをMALDIで同定する際にも使用することが可能で、RUBYゲルステインよりスペクトルの検出に適した染色剤と言えます。**

※Flamingoゲルステインの価格はP.16をご参照ください。

GEARING UP FOR PROTEIN PRODUCTION

タンパク質の生産法

"精製度の高い"タンパク質に対する要求が高まっています。ヒトゲノムプロジェクトの成功により、科学者たちは、こうしたタンパク質全てがどのような機能をしているのかを解明し、こうした知見を用いてヒトの健康状態を改善するといった、さらに大きな挑戦に挑もうとしています。こうした目標に到達するために、現在の研究者はタンパク質の発現レベルを測定し、翻訳後修飾とタンパク質間相互作用について知り、治療での適用に利用可能な量の高純度タンパク質を生産する必要があります。

タンパク質生化学に対して、新たにこのようなこと、つまり高純度タンパク質の生産に焦点を合わせる場合には、多数のタンパク質を発現させ、精製し、分析するためのツールと技術が必要となります。バイオ・ラッドは長年にわたり、サンプル調製キットや試薬、クロマトグラフィー装置や担体、電気泳動用システム、画像処理システムなど、タンパク質分析のためのツールの提供を行ってきました。これら手法の一部には、年月を経ても大きな変化はありませんでしたが、近年、いくつかの製品は著しく前進し、使用法が容易になり、再現性が向上し、結果が速やかに得られるようになっています。これらのツールは、少量のタンパク質を検出、分析、検討、また、大量の高純度タンパク質を生産したいという研究者からの要求に沿ってさらに進化を続けることでしょう。

本稿では、どのような種類のタンパク質が生産されているか、こうしたタンパク質を生産したり分析したりするためにどのようなツールが利用されているか、タンパク質の研究者は作業速度をあげ、作業効率を向上させるためにどのようなツールを求めているかなど、今日のタンパク質科学がどこに向かおうとしているのかに関しての概要をまとめました。

Rosalind Kim, PhD	Component Project Leader, Cloning, Expression, and Purification, Berkeley Structural Genomics Center, Berkeley, CA, USA

Rosalind Kim博士は、US National Institute of General Medical Science[1]（NIGMS：米国立総合医科学研究所）Protein Structure Instituteから資金提供を受けている9箇所の試験的施設のうちの一つであるBerkeley Structural Genomics Center（BSGC）で、研究室の室長を務めています。同博士の研究室では、構造解析を目的とした発現システムの開発とタンパク質の精製に焦点をあてています。

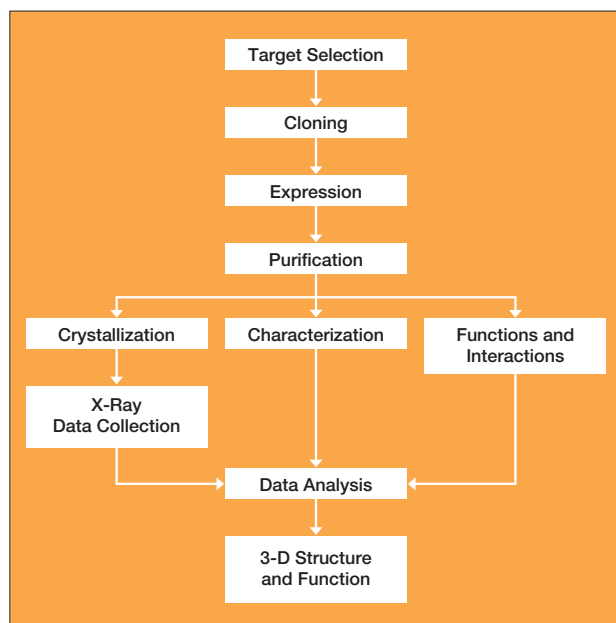
「分子生物学を習得した人はたくさんいますが、タンパク質精製の専門知識を身につけた人は多くありません」
— Rosalind Kim

Kim博士はもともと、微生物学者としての教育を受けましたが、ここ10年間は、構造生物学者として、結晶化とその後の3次元構造決定を目的としたタンパク質の精製の研究を行っています。同博士が研究分野を変えた時期は、NIGMSがProtein Structure Initiative（PSI：蛋白質構造イニシアチブ）—遺伝子配列に基づいて蛋白質の構造を導き出すことができるようにすることを最終的な目標として、蛋白質構造の幅広いスペクトルを得るための米国の国家的努力目標—に乗り出す直前でした。このタイミングが幸運にも、過去5年間、Kim博士をPSIの目標に直接関与させ、BSGCでのタンパク質生産グループを率いて研究を行ってきました。

多くのPSI研究施設と同様、BSGCは、タンパク質の精製、X線結晶構造解析、および構造解析を目的としたハイスループットツールの開発を続ける一方で、特定のタンパク質に関しての有用なデータを同時に生み出しています。Kim博士らは、小さな細菌であるMycoplasma pneumoniaeに焦点をあて、既に構造が知られたタンパク質とはほとんど相同性のない配列を有するタンパク質をターゲットとして選択しています。同博士らは、これにより、新たなタンパク質構造「新たな折り畳み構造」が同定され、これらが他の多くのタンパク質でも同様に認められるようになるのではないかと期待しています。

BSGCは、10種類の部門から構成され、それぞれがタンパク質研究ワークフローの異なる分野（下記欄外記事参照）または技術開発に特化した研究を行っています。Kim博士のグループは、クローニング、発現およびタンパク質の精製法における研究を行っています。過去5年間、同博士はタンパク質の精製のために4名の常勤研究員を雇い入れ、総量にして6〜12 kgに相当する600種類以上のタンパク質サンプルの精製を行ってきました。

Kim博士の研究グループは、構造がわかっていない可溶性タンパク質を選択した後、以下の手法を用いて、10〜20 mgのタンパク質を生産しています。まず、配列のクローニングを行い、*E.coli*で発現させます。多くのタンパク質は、精製を簡便化するためにヒスチジン（His）タグを付加しています。発酵によりE.coliを増殖させた後、菌体を溶解して、可溶性タンパク質を放出させ、その後、遠心分離により破砕された菌体を除去します。上清を固定化金属アフィニティクロマトグラフィー（IMAC）カラムに通して、Hisタグタンパク質を結合させた後、イミダゾールのグラジエントによりタンパク質を溶出させます。次に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-

構造ゲノミクスのワークフローの多くは、以下の手法を含んでいます。BSGC社の例を挙げます。

Target Selection — M.pneunomiaeのゲノムのスクリーニングを行い、構造または機能がわかっていない配列を見つけ出します。

Cloning & Expression — ターゲットのタンパク質にHis-tagが付いて発現されるようにデザインしたベクターを作製し、大腸菌を用いて大量にタンパク質を産出させます。

Purification — IMAC、イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーなど、多数のクロマトグラフィー手法を用います。純度は、ゲル電気泳動法を用いて評価します。

Characterization — タンパク質は、単量体であるか、単分散であるか、分子量が正しいかどうかなどに関する検査を受けます。

X-Ray Data Collection — 高エネルギーのX線をタンパク質結晶にあて、検出器の方向にX線を散乱させます。散乱したX線のパターンおよび密度を用いて、タンパク質の3次元構造を決定します。

Function & Interaction — タンパク質の3次元構造を、近い構造のタンパク質と比較して、機能についての仮説を立てます。これらの仮説は、生化学的測定や遺伝子ノックアウトによって、実験的に検証することが可能です。

Data Analysis — 実験データを検討し、タンパク質の構造、生化学的性質および機能などを検討します。

3-D Structure and Function — 3次元構造測定後、機能を推測し、検証することができます。

PAGE）を用いて、溶出分画を分析します。さらに精製が必要な場合には、イオン交換クロマトグラフィーを用います。さらに純度を上げるためにサイズ排除クロマトグラフィーが利用されることも多く、その後、精製されたタンパク質は、結晶学研究グループに送られて、構造解析が開始されます。

タンパク質の調製技術でKim博士が最も期待する点は、ワークフローを進行させるスピードと精度の向上です。このうちの一部は、自動化によって達成されるものであり、PSIにとっても優先順位の高いものです。博士は、新しい自動化技術が個々の研究者にとってさらに利用しやすいものとなるよう願っています。

Kim博士は、蛋白質精製法を学ぶことを人に奨励しています。同博士は「分子生物学を会得した人はたくさんいますが、蛋白質精製の専門知識を身につけた人は多くありません」と述べています。世界中で多くの研究が構造ゲノミクスの方向に進んでいることを考慮すると、博士の助言は正当であるように思われます。

Vice President of Operations and Scientific Affairs, ProteoCell Biotechnologies, Inc., Laval, Quebec, Canada

Miguel Retamal, MSc

Miguel Retamal博士は、潜在的に実用化が期待されるバイオ医薬品の精製と製造法の開発に特化した企業であるProteoCell Ciotechnologes社の共同創立者で、同社の執行および科学部門担当副社長です。

Miguel Retamal博士は、約11年間、タンパク質の精製を続けています。博士の主要な専門は、タンパク質生産の培養法ー細胞を増殖させ、目的の組換えタンパク質を大量に製造するための培養条件を設定することーです。バイオ医薬品製造業界に共通するものとして、Retamal博士が精製してきたタンパク質もその多くは、抗体です。こうした抗体のうちの一部は、ブタインフルエンザや顕性疾患の検出用のキットなど、診断に使用されています。Retamal博士はさらに、慢性関節リウマチの生物療法薬、一部の血液凝固因子、腫瘍融合タンパク質も製造しています。博士は全部で、100種類以上もの蛋白質の製造工程について、研究を行ってきています。

Retamal博士らは、中小企業による、ヒト体内への注射用タンパク質医薬の製造工程の開発を支援するために、ProteoCell Biotechnologies社を立ち上げました。ProteoCell Biotechnologies社の科学者たちは、治療薬となる可能性があるタンパク質を同定した顧客と共に作業を行い、その製造のための遺伝子組換え技術を支援し、研究開発および前臨床試験に十分な量のタンパク質を製造するための精製工程をデザインしています。ProteoCell Biotechnologies社では、新しい施設が現行の医薬品の臨床試験の実施に関する基準（current Good Clinical Practice、以下cGCP）に適合した暁には、臨床試験用のタンパク質の製造も予定しています。

ProteoCell Biotechnologies社のような企業にとって最大の難関は、開発されたあらゆる精製工程は、大量のタンパク質を製造するために規模の変更が可能なものでなければならないということです。Retamal博士によると、2,000 Lのリアクターで1 kgのタンパク質を製造するための培養回数は、1回から10回となります。現在のところ、最新の技術の多くは、このような大規模な製造に適用することができません。そのため、工程の開発では、研究目的のために少量のタンパク質を製造するに過ぎない初期段階であっても、その後の段階で大規模な製造のために新たな工程の開発が必要となることから、こうした手法を含む意味はなくなります。新たな手法で規模の変更が可能となるまでは、大規模製造を目指す企業は、カラムクロマトグラフィーやTFF（Tangential Flow Filtration；クロスフロー濾過）など、証明され、許容されている手法を用いざるを得ないのです。

> 「常に、生化学の教科書を手元において置くようにしなさい」
> — Miguel Retamal

ProteoCell Biotechnologies社の精製工程は、対象となるタンパク質の遺伝子組換え、アフィニティクロマトグラフィーでの精製を促進するためのHisタグの付与、原核細胞または哺乳動物細胞での発現、発酵または細胞培養、細胞溶解（Lysis）とその後の細胞破砕、そして最後に、通常はIMACから始まることの多い一連のク

ロマトグラフィー手順など、Kim博士の研究室のワークフローと類似しています。クロマトグラフィーとろ過手順の後、製品の生理活性を検定します。すべてのタンパク質に対して種々の生理活性アッセイが用いられますが、こうした測定では培養細胞自身がもつ代謝活性が、タンパク質医薬品の活性測定に影響してしまうことも少なくありません。

タンパク質処理工程でRetamal博士が期待し、将来開発の見込まれる手法の一つに、製造後のタンパク質の迅速な回収法があります。通常は、培養と蛋白質精製間にはタイムラグがあり、この間に、目的のタンパク質が分解したり、活性を失ったりします。あるいは、発現させたタンパク質は、それを製造した細胞に対して毒性を示すこともあります。そのため、製造中にオンラインでタンパク質を継続的に除去・分離できるツールは、きわめて有用と思われます。

一方では、糖タンパク質に付加された糖鎖を分析する効率的かつ正確な方法が求められています。正しい糖鎖の付加は、特にワクチンにおいて、活性にさまざまな相違を生ずることがあります。アミノ酸配列が正しいタンパク質が精製されても、誤った配列の糖鎖が付加していることによって活性が75%も低下することがあります。タンパク質製剤では、糖鎖の付加は可溶化能においても非常に重要なものです。正しい糖鎖付加が行われれば、可溶性を向上させるために必要とされる他の非生物学的な分子を加える必要がなくなります。そのため、糖鎖の付加は今後、タンパク質の製造において、より重要な役割を果たすようになるでしょう。

タンパク質科学でのキャリアを積もうと考えている若い科学者に対して、Retamal博士は以下のような助言を行っています。「常に、生化学の教科書を手元において置くようにしなさい」。博士は、たとえ研究に十分な技術を身につけたとしても、別のタンパク質に応用しようとする際には、それがまったく役に立たないこともある、と説明しています。タンパク質は、他の生体分子に比べてかなり複雑であるため、たった一つのアミノ酸が変わっただけで、特定の精製環境での挙動が変化することがあるのです。そのため、状況に漫然と対応するようなことがあってはならないのです。実際に目的のタンパク質を精製する前に、取り扱おうとするタンパク質について常に十分に検討しなければなりません。

Steven Chamow, PhD	Vice President of Process Sciences, Genitope Corporation, Redwood City, CA, USA

Steven Chamow博士は、非ホジキンリンパ腫（NHL）の治療を目的としたテーラーメイド免疫療法を開発するためのバイオテクノロジー企業であるGenitope CorporationのProcess Science部門担当副社長です。

Chamow博士は生化学者としての教育を受け、自然界におけるタンパク質の特有の性質と重要な役割により、タンパク質に心を惹かれ続けています。構造により機能が決定され、タンパク質では複数のレベルの構造が優雅で単純な方式により機能に影響を及ぼしています。Chamow博士は「私にはこれが魔法のように思える。ここには魔法の要素があるーこれが、科学の道に引き込まれる理由だ」と説明しています。

Genitope Corporationは、NHL患者に対して患者特異的なワクチンを製造するためのタンパク質の発現系統を商業化することを目的として、1996年に設立されました。こうしたワクチンは、個々の患者の腫瘍に特異的な免疫グロブリン（Ig）タンパク質に基づくもので、腫瘍自体から得られます。NHLでは腫瘍はB細胞から生じ、B細胞と同様、腫瘍細胞は細胞表面で、特異的かつ独特なIgを発現します。ワクチンを開発するために、Genitope社では、患者Igの種々の抗原結合部分と、ヒトIgGを構成する定常領域を用いて、組換えIgを構成します。この組換えIgをキャリアタンパク質と融合させ、免疫賦活剤と組み合わせて、注射可能なワクチンとします。すなわち、ワクチンの一部として、Igが抗原となり、患者自身の免疫系を刺激して腫瘍細胞を攻撃し、その一方で、患者の他のB細胞には無害となるようにします。現在実施中の第Ⅲ相臨床試験で問題がなければ、この有望な新しい治療法は、今後、数年のあいだに、患者にとって役立つものとなることでしょう。

Genitope社では、患者特異的なタンパク質を製造しているため、

Genitope Corporationでは年間、何千種類もの組換えIgをクローニングし、精製しています。

タンパク質精製での課題は、他の組換えタンパク質製造の場合とはやや異なります。他の企業での大きな懸念は、規模を増大させることー大量のタンパク質でも十分に利用できる精製戦略を見つけ出すことです。
Genitope社では、単独の患者に対するワクチンを製造するために十分な量のタンパク質を産生するだけですので、こうした問題はありません。さらに、単独の独特なワクチンの精製のため、Genitope社でのタンパク質精製は、たいてい、1回だけとなります。最終的に、同社では、毎年、独特な製造法および精製法の異なる可能性のある何千種類もの Ig が、クローニングされて精製されることになります。すなわち、Genitope社での最大の課題は、単独製品としてのあらゆる患者組換えIgで十分に機能する、一般的かつ自由度の高い工程を開発することです。
Chamow博士は、こうした課題に対して、うってつけの人材だったのです。過去20年以上にわたるタンパク質精製工程の開発で同博士は、ある種のクラスのあらゆる分子に対して十分に機能する、より一般的な（プラットフォーム）かつ製造効率が高い工程となるよう、絶えず努力を続けてきました。こうしたアプローチは、抗体で十分に生かされ、個々の分子が独特な性質を有するにもかかわらず、共通した性質を用いたプラットフォーム工程が構築されています。こうした工程の基本的な特徴は、ProteoCell Biotechnologies社やBSGCが利用しているプラットフォームと類似しています。
Chamow博士は、いずれは、タンパク質製造工程がさらに連続的なものになると考えています。今日では、未だ不連続的な操作ーたとえば、クロマトグラフィー操作後に2回目のクロマトグラフィーを行って濾過を行うなどーを利用して、ダウンストリーム工程がデザインされています。こうしたデザインは部分的に、バイオ医薬品の品質と安全性をあらゆる方法に沿って評価するという規制当局（FDAなど）からの要請によって形作られているものです。しかし、生産性の高い組換え工程では、このようにして力価を増大させせることにより、ダウンストリーム工程では、精製に必要なタンパク質の量を増大させなければならないという負担がのしかかります。こうしたダウンストリーム的な工程をより連続的なものにすることで、精製速度が上がり、処理量が増大することになります。

> 「毎日、研究に取り掛かるたびに、患者の生命にとって本当に価値のある、有望な治療薬で患者を治療できるようになる日が近づいているのだと考えています。これは、とても満足のゆくことです」
> — Steven Chamow

Chamow博士がタンパク質の精製でもっとも楽しみにしているのは、複雑な混合物、すなわち、ターゲット分子を含有する培養細胞からの回収サンプルを取り扱い、これを高純度に精製して、生理活性の高く、よく知られた、人々の役に立つ薬にすることです。同博士は「毎日、研究に取り掛かるたびに、患者の生命にとって本当に価値のある、有望な治療薬で患者を治療できるようになる日が近づいているのだと考えています。これは、とても満足のゆくことです」と述べています。
Miguel Retamanl博士と同様、Chamow博士も、新たなタンパク質科学者に対して、研究中の各々の新しいタンパク質についてはできる限り多くのことを知るよう、助言しています。「文献をあたりなさい」と博士は述べています。他の研究者が、自分のターゲットタンパク質（または関連するタンパク質）の構造、機能、分子量、pI などについて調査した知見を見出しなさい、と。こうした要素はすべて、タンパク質がクロマトグラフィーでどのような挙動をするかということに影響を及ぼしてきます。「タンパク質精製で成功するためには、対象とするタンパク質についての知識および理解が必要となります。対象とするタンパク質について知れば知るほど、そして、その性質を重視すればするほど、成功の可能性が高くなるのです」。

本稿に記述した研究に関して、さらに理解を深めるために、以下のウェブサイトをご参照ください。

Berkeley Structural Genomics Center:
http://www.strgen.org

Dr Kim's group at the BSGC:
http://www.strgen.org/about/cloning.html

ProteoCell Biotechnologies, Inc.:
http://proteocell.com

Genitope Corporation:
http://www.genitope.com

The NIGMS Protein Structure Initiative:
http://www.nigms.nih.gov/psi/

The Protein Data Bank, "the single worldwide repository for the processing and distribution of 3-D biological macromolecular structure data":
http://www.rcsb.org/pdb/

まとめ

プロテオームの時代は、始まったばかりです。タンパク質はそれぞれ異なるため、タンパク質科学の実験を実際に行うためには、さまざまなツールを選択することが重要です。本稿で示した研究プロファイルのように、研究には依然として課題がつきまとっていますー製造工程はさらに洗練されることを必要としており、研究対象となる新たなタンパク質それぞれについて最適化が必要です。そのため、タンパク質化学の教育を十分に受けた科学者が必要とされるでしょう。タンパク質の精製および性質検討用の手法を改良して自動化したり、膨大な量のデータを保存および判定する手段を開発したりするためには、エンジニアやコンピュータサイエンティストとのコラボレーションも必要となります。しかし、タンパク質は新たなバイオ医薬品を開発するものとなり、さらに別のタンパク質製剤によってヒトの健康が向上することを考えれば、こうした研究は、有望なものと言えるのではないでしょうか。

グアニジン溶解チトクロム-Cのハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー

（— Interfacial Refoldingの可能性 —）

ペンタックス株式会社　ライフケア事業本部　ニューセラミックス事業部　第二開発室　吉武朋彦

はじめに

ハイドロキシアパタイトは$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$からなる無機物質であり、結晶表面にはカルシウムイオンの正電荷とリン酸塩基の負電荷の2つのサイトを有しています。このため、ハイドロキシアパタイトは等電点が酸性から塩基性にいたる幅広い範囲の生体高分子類を分離・精製する担体として広く用いられてきました。一般的にハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーではリン酸緩衝液が適用され、リン酸の濃度に依存してその溶出は酸性から塩基性の順序で行われることが知られています。一方、抗体やエンドトキシン、核酸を溶出する場合には塩化ナトリウムを併用した溶出液が適応されることもあります。また、特殊な系としては、変性剤、界面活性剤が添加された溶出液での溶出があります。緩衝液などに不溶性のタンパク質を可溶化するためには、一般的に尿素、塩酸グアニジンなどの変性剤や、SDSなどの界面活性剤が用いられています。尿素は中性であるため、様々なイオン交換クロマトグラフィーでの溶出が行われていますが、可溶化能力の高い塩酸グアニジンやSDSなどのイオン性のものではイオン交換クロマトグラフィーでの溶出が困難とされています。しかし、ハイドロキシアパタイトではSDSを添加した溶出液によるSDS処理タンパク質溶出の報告があります。この様にハイドロキシアパタイトではイオン交換クロマトグラフィーでは困難とされる溶出液でも溶出が行える可能性があるため、今回はイオン性の変性剤であるグアニジンを添加した溶出液によるグアニジン溶解チトクロム-Cと、その応用としてグアニジン溶解熱変性チトクロム-Cのハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーを行いました。

図1. チトクロム-C溶液
a：未変性、b：2Mグアニジン溶解、c：加熱処理、d：加熱処理して得られた沈殿物を2Mグアニジンで溶解、e：加熱処理して得られた沈殿物を2M Ureaで溶解

方　法

タンパク質試料の調製

グアニジン溶解チトクロム-C溶液：
凍結乾燥チトクロム-Cを5 mg/mlとなるように2 Mグアニジン溶液を加えて溶解させ、室温で24時間以上保持しました（図1-b）。

グアニジン溶解熱処理チトクロム-C溶液：
凍結乾燥チトクロム-Cを5 mg/mlとなるようにリン酸ナトリウム緩衝液を加え、4℃で溶解させました（図1-a）。マイクロチューブに0.3 mlを分取し、100℃で5分間加熱処理し、沈殿物を得ました（図1-c）。熱処理後、室温で5分間保持し、遠心分離を行いました。上精を除去し、2 Mグアニジン溶液0.3 mlを加えて溶解させ、室温で40時間以上保持しました（図1-d）。

カラム
充填剤は、セラミックハイドロキシアパタイト充填剤（CHT Type-Ⅱ, 粒子径：40 μm, Bio-Rad Laboratories）を使用しました（カラムサイズ：4.0 I.D.×100mm）。基本的にこの粒子径（40 μm）の充填剤は分取を目的とするものですが、市販されている充填剤の多くが分取用であるため追試のしやすさを考えてこの粒子径の充填剤を用いました。

溶出液
非グアニジン溶液：初期溶出液（1 mM Sodium phosphate buffer,pH6.8）、後期溶出液（400 mM Sodium phosphate buffer,pH6.8）。グアニジン溶液：初期溶出液（1mM Sodium phosphate - 2M guanidine buffer, pH6.8）、後期溶出液（400mM Sodium phosphate - 2M guanidine buffer, pH6.8）。

結果と考察

まず、定法として用いられるリン酸緩衝液、つまり非グアニジン溶液で未変性チトクロム-CのCHTクロマトグラフィーを行ったのが図2です。チトクロム-Cは塩基性タンパク質であるため、非グアニジン溶液ではCHTカラムに強く保持されます。
次に、グアニジンで溶解させたチトクロム-C、つまりグアニジンで変性したと考えられる状態を保ったままクロマトグラフィーを行うため、グアニジン溶液でクロマトグラフィーを行ったのが図3です。先ほどの非グアニジン溶液とは異なり、グアニジン溶液では3つのピークが確認され、その全てが非グアニジン溶液での保持位

置より早くなりましたが、比較的高濃度のイオン性物質が存在するグアニジン溶液でもチトクロム-CはCHTカラムに保持されました。そして、先ほどとは溶出液を変え、非グアニジン溶液でクロマトグラフィーを行ったのが図4です。グアニジン溶液とは異なり、チトクロム-Cを 2Mグアニジンで溶解したにもかかわらずその保持位置、ピーク形状のどれも未変性チトクロム-Cとほぼ類似していました。この結果は、チトクロム-Cがグアニジン変性状態から未変性状態に移行したと推察できます。

最後にこれまでの応用として、熱処理したチトクロム-Cのクロマトグラフィーを行いました。チトクロム-C溶液を熱処理すると溶液の赤色はほとんどなくなり、沈殿物が得られました(図1-c)。沈殿物のままではクロマトグラフィーにかけられないため、2Mグアニジンを加えるとほぼ溶解し、元の赤色溶液に戻りました(図1-d)。これは熱変性状態からグアニジン変性状態に移行したことになります。この際、沈殿物は2M尿素ではほとんど溶解しませんでした(図1-e)。図5は2Mグアニジンで溶解した熱処理チトクロム-Cを試料とし、非グアニジン溶液で溶出したクロマトグラムです。100℃の加熱によりチトクロム-Cは一端、沈殿物になったにもかかわらず、グアニジンで溶解し、非グアニジン溶液でのCHTクロマトグラフィーを行うと、その保持位置、ピーク形状のどれも未変性チトクロム-Cとほぼ類似する結果となりました。この結果は、チトクロム-Cが熱変性状態からグアニジン変性状態に、最後には未変性状態に移行したと推察できます。

結　論

CHTでは比較的高濃度のイオン性物質が存在するグアニジン溶液でもクロマトグラフィーが可能であることと、グアニジンで溶解したチトクロム - Cの溶離が可能であることが確認できました。また、グアニジンで溶解したチトクロム - C、さらにはグアニジンで溶解させた熱処理チトクロム - Cでも、非グアニジン溶液のCHTクロマトグラフィーを行うと、その保持位置は未変性チトクロム-Cとほぼ同じになりました。これらは、Interfacial Refoldingに関与する現象であると考えられます。グアニジンや尿素は組換えタンパク質を発現させた場合に生じる不溶性封入体を可溶化させる際によく用いられますが、この実験はその様な処理を行ったタンパク質の精製に応用が期待できます。

References

T.Kadoya、T.Isobe、M.Ebihara、T.Ogawa、T.Okuyama、Journal of liquid chromatography、9(16)、3543-3557(1986)

吉武朋彦、小林伸太郎、奥山典生、Chromatography、Vol.25、No.Supplement 2、39-40(2004.10.29)

木城きくか、吉武朋彦、小林伸太郎、小川哲朗、奥山典生、日本生物工学会大会講演要旨集、Vol.2005、225(2005.09.25)

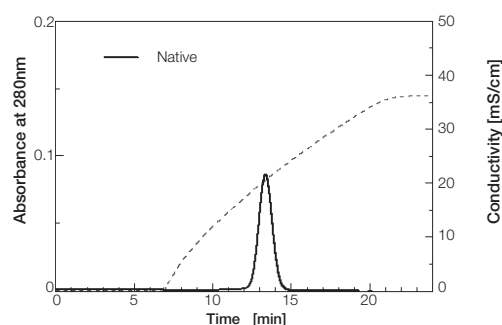



図2. チトクロム-Cのクロマトグラム(非グアニジン溶液)
CHTカラムで未変性チトクロム-C(Native)を非グアニジン溶液(リン酸緩衝液)で溶出した。

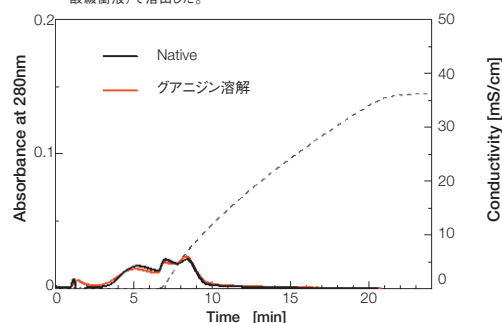



図3. グアニジン溶解チトクロム-Cのクロマトグラム(グアニジン溶液)
CHTカラムで未変性チトクロム-Cとグアニジン溶解チトクロム-Cをグアニジン溶液で溶出した。

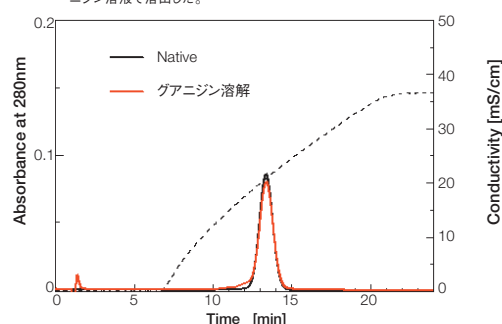



図4. グアニジン溶解チトクロム-Cのクロマトグラム(非グアニジン溶液)
CHTカラムで未変性チトクロム-Cとグアニジン溶解チトクロム-Cを非グアニジン溶液(リン酸緩衝液)で溶出した。

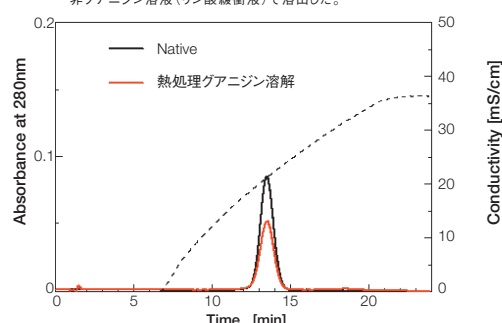
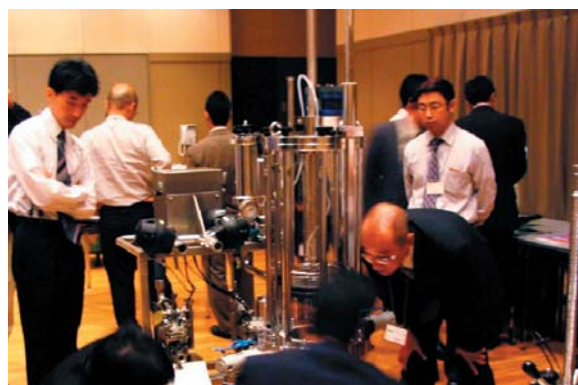



図5. 熱処理チトクロム-Cのクロマトグラム(非グアニジン溶液)
CHTカラムで未変性チトクロム-Cとグアニジン溶解した熱処理チトクロム-Cを非グアニジン溶液(リン酸緩衝液)で溶出した。

第3回 CHTセラミック ハイドロキシアパタイト シンポジウム

2005年10月4日　於:薬業健保会館

概　要

2005年10月4日薬業健保会館にて、第三回CHTセラミックハイドロキシアパタイトシンポジウムが開催されました。抗体医薬の世界市場が2010年には約3倍以上（vs2005年）になると予想されている中、世界最大手のほとんどの医薬品メーカーで、CHTが製造プロセスで使用または検討されてきていることがわかってきました。
なぜ、このCHTがタンパク医薬品の臨床段階にこれほどまで採用されるようになってきたのか。
その理由を探るべく、このシンポジウムでその最新アプリケーション情報やマテリアルについての基本情報などが、紹介されました。
出席者は、国内外からの講師を含めて約70名で、国内のバイオ医薬の開発を行っているほとんどの医薬品企業様からの出席もいただき、CHTハイドロキシアパタイトに対する関心が高いことがわかりました。

また、このCHTをパッキングする大型カラムについても講演、及び展示が行われ、自動充填・取出し／自動洗浄が行えるプロセス用大型カラムGeltecの周りには多くの聴講者が集まり、関心の高さが窺われました。
講演は全部で7演題、約4時間にわたって行われました。
講演内容及び演者の先生方は右ページの通りです。

今回の講演では、各先生方から多くの貴重なアプリケーションについてのプレゼンテーションがありましたが、その中から、ハイドロキシアパタイトとタンパク質との基本的な相互作用や、実際バイオ医薬の精製に使用されているアプリケーション、及びCHTだけに見られる特徴的な分離パターン等のその一部について次の通りご紹介させていただきたいと思います。

1. **CHTの基本特性とバイオプロセスへの導入**
   ペンタックス株式会社 ニューセラミックス事業本部
   開発部部長 小川 哲朗
2. **アパタイトクロマトグラフィーによる**
   タンパク質分離プロセスの設計方法
   山口大学 工学部教授 山本 修一
3. **免疫グロブリン領域における分離解析について**
   首都大学東京 名誉教授 奥山 典生
4. **プロセス用CHTカラムによる海苔色素タンパク分離**
   ペンタックス株式会社 ニューセラミックス事業部 小林 伸太郎
5. **Introduction about Bio-Rad's industrial scale chromatography columns and cleaning in place capabilities**
   France Bio-Rad Laboratories Process Hardware
   Research & Development Manager Pierre Vidalinc
6. **Purification of monoclonal IgG with CHT ceramic hydroxyapatite**
   USA Bio-Rad Laboratories R&D manager of Process
   Applications Dr. Peter Gagnon
7. **バイオ医薬品の市場動向、及び**
   バイオ・ラッドのプロセスクロマトグラフィー製品
   日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社
   ライフサイエンス事業本部 プロセスクロマトグラフィー
   中村幸二

講演の後には懇親会も行われ、タンパク医薬や機能性タンパクの精製についての質疑応答が行われました。

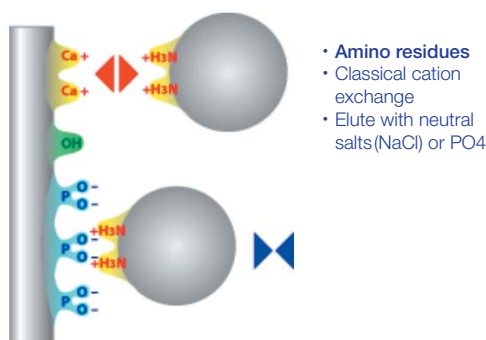



図 1

塩基性タンパク質の場合は、基本的にはP-siteとアミノ基による静電結合となります。但し、カルシウムC - siteとアミンとの間に反発を起こしますが、1mM程度の遊離のリン酸イオンがあるとC -siteとイオンペアーを形成することによってその反発を抑制します（これによって塩基性タンパク質の結合が強化される場合があります）（図1）。溶出は、50 - 500 mMの塩素イオンあるいはリン酸イオンによって溶出されます。

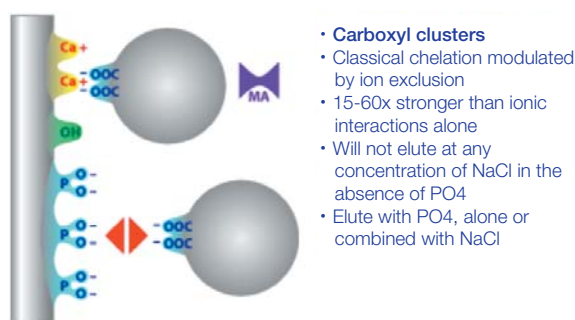



図 2

酸性タンパク質の場合では、P - siteとカルボキシル基がイオン的に反発しあいますが、C - siteとカルボキシル基との間ではより強固な配位結合が関与しているため、実際はイオン結合より強固に結合しています（図2）。そのため、通常のイオン交換的吸着溶出挙動とは異なり、3.0 M以上の高食塩濃度でも溶出されず、溶出させるにはC-siteへより強い親和性を示すリン酸イオン、クエン酸イオン、フッ素イオン等が必要となります。このことは酸性不純物質を含むサンプルから食塩によって目的物質だけを溶出することが可能となります。特に、塩基性タンパク質の性質を示す抗体のような物質によっては重要なポイントです。すなわち、DNAやエンドトキシンをカラムに結合させたままIgGのみを溶出することが可能となります。

第3回 CHTセラミックハイドロキシアパタイト シンポジウム

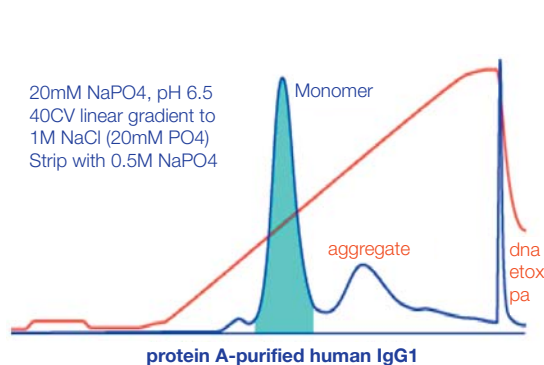



図3

これは、実際抗体医薬の精製に使用されているアプリケーション例で、プロテインA処理後のサンプルに対してCHTハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーを行った結果が（図3）となります。このアプリケーションは、20 mMのリン酸バッファーをベースにして、1 MのNaClでグラジェント溶出を行っています。ここでは、抗体とAggregates（毒性を示す場合がある）のピークがクリアーに分離されており、DNA、Endotoxin、プロテインA等については担体に結合したまま最後まで溶出してきません。この場合に得られた抗体画分のPurityは（表1）の通りとなります。

- **Aggregate removal**
  - ― > 99% by SEC
  - ― from > 40% to < 1%
- **Leached protein A removal**
  - ― 90% by Cygnus
  - ― from > 55 to < 5ng /ml
- **DNA removal**
  - ― > 3 logs by PCR
  - ― down to < 1ng /ml by picogreen
- **Endotoxin removal**
  - ― 7 X 10^4 by LAL
  - ― down to 1EU/ml

表1

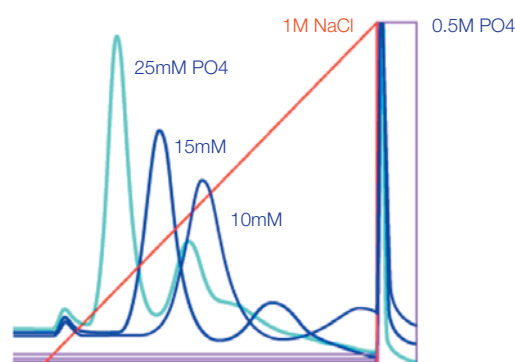



図4

また、上記（図3）のアプリケーション例に対し、ベースとなるリン酸塩濃度を10、15、25 mMと変化させてクロマトグラフィーを行った結果が、（図4）となります。2つのピークパターンに変化が見られます。

Protein A-purified human IgG1, CHT type I, 20 micron, pH 6.5

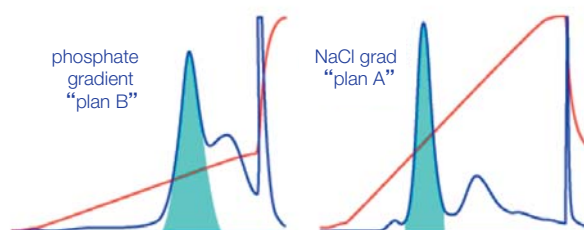
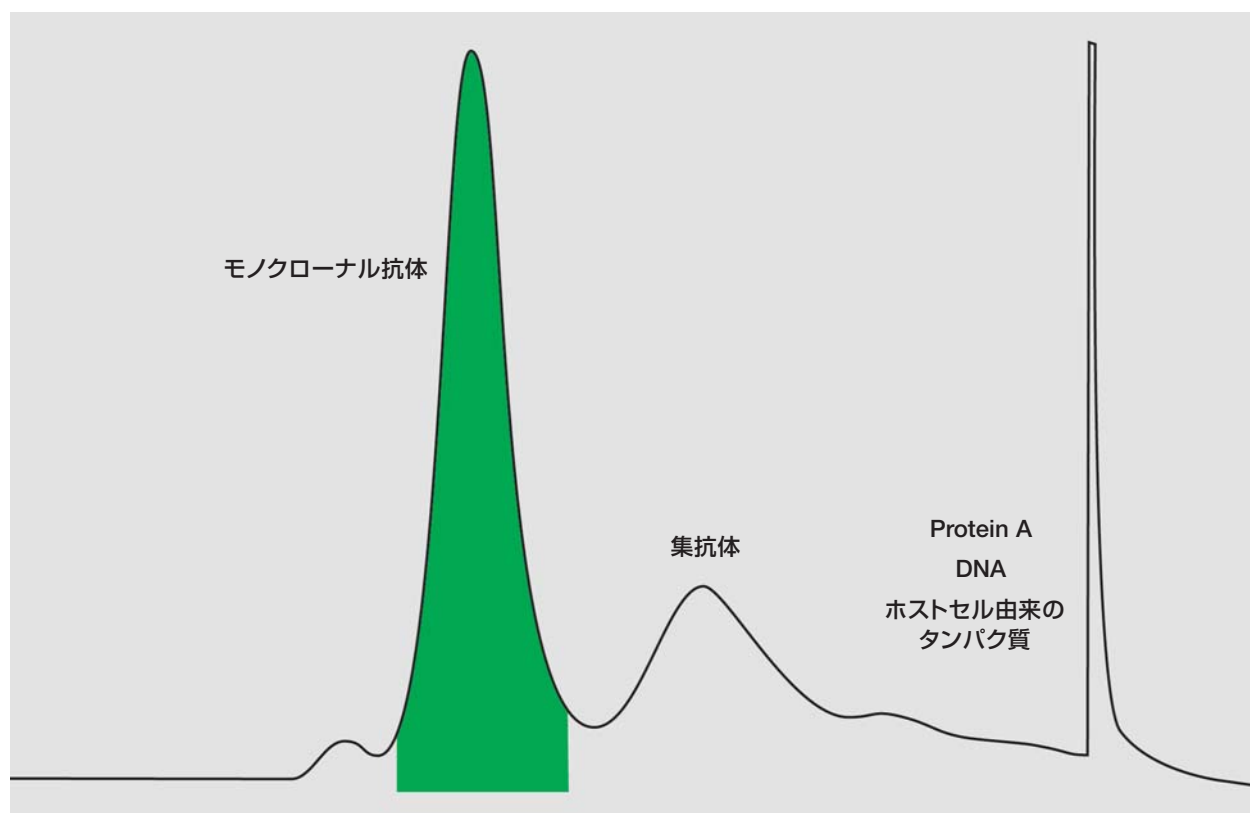



図5

今度は、（図3）のアプリケーション例（図右）と、リン酸塩だけでグラジェント溶出（図左）を行った比較例が（図5）となります。リン酸塩をベースにしてNaClでグラジェントを行った方が、抗体画分のPurityが高くなることがわかります。

これらのように、CHTハイドロキシアパタイトは、溶出塩の濃度と種類によって異なる溶出パターンを示し、タンパク医薬等にとって最も要求されるAggregates、DNA、Endotoxin、プロテインA等の除去を効果的に行います。またこれらの理由から、現在ではタンパク医薬精製の世界スタンダード担体として、世界最大手のほとんどの医薬品メーカーで、製造プロセスで使用または検討されていることが知られています。

Bridge バイオ・ラッドと、お客様をむすぶ「架け橋」としてコメントを紹介します

高校生物における Explorerキットの活用

～全国各地に続々と導入されています～

埼玉県立川越初雁高等学校　原　由泰 先生

バイオ・ラッドの実験キットと初めて出会ったのは、東京農工大の「平成13年度　理科教員のための組換えDNA実験研修会」でした。研修2日目に紫外線をあてたコロニーが緑色になった光景は、今も忘れることはできません。遺伝子の組換えは、生徒が興味関心を示す分野です。それまでもムーンダスト※を見せたりしてきましたが、自分で組換えを行った感動の比ではありません。この研修会で今年度（平成13年度）中に高校の現場でも組換え実験が実施できるようになると聞き、3月に3年生の希望者を対象にキット1を使って実験をしました。卒業式後にも関わらず40名近い生徒が参加し、緑色になったコロニーを見て、こちらの思惑どおり歓声をあげていました。それ以来、毎年、キット1にはお世話になっています。一昨年度は他のキットも使い、様々な経験を積ませて頂きました。

この度、前任校でのこれらの実験の感想を、拙い文で申し訳ないですが、以下のようにご報告させていただきます。バイオ・ラッドの実験キットの使用を考えられている先生方や、よりよい実験キットの開発のために、少しでもお役に立てれば幸甚に存じます。

※現在販売されている遺伝子組換えカーネーション（切花）

ーキット1　（pGLOバクテリア遺伝子組換えキット）

毎回、組換えた大腸菌に紫外線をあてた時の生徒の驚きに新鮮な感動を覚えます。緑色のコロニーをみると生徒の頭の中で机上の理論が実物として動き出すようです。LB／ampのコロニーにアラビノースをかけ緑色の蛍光を発するようになると、オペロン説もすんなり理解できるらしいです。

ーキット2　（GFP精製クロマトグラフィーキット）

溶菌をおこなうのに使用したリゾチームについては、自分の涙の中にあるからかとても興味を持ったようでした。クロマトグラフィーは光合成色素の分離などで経験済みですが、このキットのようなカラムタイプや、水に対する性質をうまく利用して精製をおこなうクロマトグラフィーは、初めての経験なので驚いていました。大学でこの方面に進む生徒にとってはよい経験になったと思います。この実験をやることによって、大腸菌自身が蛍光を発するのではなく、GFPというタンパク質が蛍光を発するということをしっかり確認できたようです。

ーキット8　（PV92　PCR/Informaticsキット）

DNA鑑定という言葉が毎日のようにマスコミをにぎわしているので、生徒の関心が特に高い実験でした。前年の失敗に懲りて、サーマルサイクラーのプログラムを含めて複数の目で確認して実施しましたが、今回も増幅に失敗してしまいました。いっしょに実験を行った卒業生が大学の研究室で聞いたところによると、使用したサーマルサイクラーが旧型で、増幅中にマイクロチューブ内での蒸発による濃度変化を防ぐオイルを入れなかったためではないかとのことでした。そういわれれば増幅を終わったマイクロチューブの上部に水滴がついていました。昨年8月、文科省のSPPで大学へ研修に行った際に、この点をお聞きしたところ、以前はマイクロチューブを上から加温できなかったので、ミネラルオイルを入れて行ったという話を聞き合点がいきました。覆水盆に返らずですが残念です。

ーキット9 （Protein Fingerprintingキット）

秋田や北海道にいる卒業生にも捜してもらったのですが、時期が悪かったようでヤツメウナギが手に入らず、チョウザメも最近になって料理にだしている店の話を聞きましたが後の祭りでした。普段からの情報収集の大切さを痛感しました。実験そのものは順調にいき、結果を見比べながら生徒同士でいろいろ議論をしていました。生物学に興味関心が高い生徒だけで実験を行ったということもあるのでしょうが、教員をまじえずに生徒同士で意見交換ができるのはキットの作りがしっかりしているからだと思います。感心しました。ただ、手袋をしなければいけないところなど注意を要するところは、一目でわかるよう生徒マニュアルやクイックマニュアルの表記に工夫して頂ければと思います。また、インターネットでいろいろ捜しましたが、日本語で説明したこの実験で必要なレベルの系統樹の適当なものが見あたりませんでした（最近、やっと魚類の目レベルの系統樹が載っている本を探しましたが・・・）。そのへんが心残りです。この実験で耐えられるような少し詳しい魚類の系統樹をマニュアルにのせるか、紹介して頂けたらと思います。

ーELISA イムノ Explorerキット

キットを3つに分け、全てのプロトコールを実施しましたが、生徒が一番喜んだのはプロトコールⅢです。感染源探しは推理小説の謎解きをするのと同じような楽しさがあるようで、意見をお互い出し合いながら熱心にやっていました。毎年、カイコに墨を注射して顆粒細胞が墨を補食した状態や、ブタの血を使って免疫細胞が納豆菌を補食した状態を顕微鏡で観察させていますが、それらに比べると、準備に時間がかからず、目でしっかりと確認できるので助かりました。抗原抗体反応の実験として、以前はABO式血液型の判定ができましたが、現在は適当なものがなく困っていました。その点でもこのキットが開発されて良かったです。欲を言えば、血液型で観察させることのできた凝集反応も観察できるようなキットになってくれればと思います。そのようなステップが入ると、抗原抗体反応やELISAについてもっと理解が進むのではと思います。

ーGene in a Bottle キット

毎年、遠心分離器を使ってサケの精巣からDNAを抽出したり、酵素を使って鶏の肝臓からDNAを取り出したりしてきましたが、それらの実験と比べると、あまりにも簡単にDNAを取り出すことができるので拍子抜けしました。エタノールで析出させた自分のDNAを不思議そうに眺めている生徒の姿が印象的でした。糸状のDNAはサケなどで見慣れているのですが、自分のDNAというのが生徒にとってはインパクトがあるようです。実験自体は時間もかからず順調に終わったのですが、一つだけ予想外のことがおきました。生徒自身の体調、あるいは強くこすりすぎたことが原因なのかもしれませんが、1人の生徒が口内に炎症をおこして医者へ行きました。数日したら治ったので、問題と言うことではありませんが。

ー最後に

使用したどのキットも生徒の立場に立ってよくできていると思います。マニュアルも詳しくて大変参考になりました。使用する薬品の危険性も丁寧に書かれていて助かりましたが、万が一、間違った使い方をしたときに備えて、危険性のレベル（例えば仮に手についても水で洗い流せば大丈夫・・・など）について書いてあれば、なお助かります。次に学生用マニュアルについてですが、学生用マニュアルをそのまま生徒に手渡して実験を行える学校と、行えない学校が存在します。また、生徒の理解に応じて、手順の表現を変えた方がスムーズにいく場合も多々あります。学生マニュアルについては、現場の教員が文章をいじれるような形でわたしていただければありがたいです。感想というより注文が多くなりましたが、今後も現場が使いたくなるような教材の開発を期待しております。

SSHにおける遺伝子リテラシー教育プログラムの開発

Bridge

～『PV92 PCR / Informatics』キットを使っての「バイオインフォマティクス」「生命倫理」～

芝浦工業大学柏中学高等学校　SSH研究部　奥田 宏志 先生
http://www.ka.shibaura-it.ac.jp/ssh/index.html

芝浦工業大学柏中学高等学校は千葉県柏市にある男女共学の中高一貫校で、文部科学省より平成16年度スーパーサイエンスハイスクール（SSH）の研究開発校に指定されました。
本校に入学してくる生徒の多くは、入学の準備にエネルギーを注ぎ、正解が一つであることを前提とした思考に慣れ、体験的あるいはコミュニケーションによる問題解決能力が知識や技術の訓練に比べて不足気味だと感じています。このような生徒たちに科学技術分野において、基本的知識をもとに、より体験的で、より主体的な学びの場を提供し、問題解決を重視した授業を実践していくことで、将来、創造性と個性ある科学技術のトップランナーの育成ができると考えています。現在高校一年生の希望者を対象としたSSCI（芝浦サイエンスクラスI）を編成し、先端科学授業（生命科学・化学・数学）を開講しています。今回は、その中から生命科学における取り組み「遺伝子リテラシー教育プログラム」を紹介します。

―遺伝子リテラシー教育プログラム概要（下図参照）

「遺伝子」を取り巻く社会状況は多様に変化し、「遺伝子組換え食品」、「遺伝子診断」･･･ 等「遺伝子」に関係する様々な言葉が新聞をにぎわしています。しかし高校で「遺伝子」や「DNA」について学習するのは、主に生物を選択した生徒だけというのが現状です。このような状況をふまえ、SSCIにおいて「Biotechnology　Explorer」キットを中心に他教科・他大学と連携する「遺伝子リテラシー教育プログラム」を開発しています。基本的知識の習得には、『Gene in a bottle（ヒトDNA抽出実験）』キットと『pGLOバクテリア遺伝子組換え』キットを使用しました。このキットの利点は、マニュアルがとても工夫されており、発展性があることや、バイオ・ラッド社のHPからキットに関する様々な情報が入手できる等のサポートも充実しているところです。これらのキットを使うことで、基本的なことから、実験室の閉鎖系のレベル・個人情報の保護・インフォームド・コンセントの必要性等も実験を通して学習することができました。
次に、より理解を深めるために東邦大学理学部と連携し、

図．遺伝子リテラシー教育プログラム概要

PCR法によるALDH2（アルデヒド脱水素酵素2）遺伝子の多型分析とDNAシークエンサーによる配列決定を行いました。遺伝子が自分の体の形質に直接関係していることを知り、遺伝子をより身近に感じたようです。上記の一連の実験後に、『PV92 PCR/Informatics』キットを使い発展させていきます。

―『PV92 PCR / Informatics』キットの活用例

【バイオインフォマティクス】

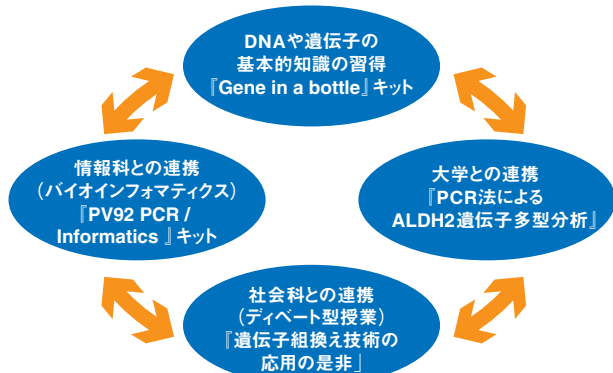
本校は併設の中学入学時から一人に一台のノートPCを持たせ、情報教育に力を入れています。このような背景をもとに情報科と協力し、「バイオインフォマティクス」（生物学的データを採取し、処理するために、数学、統計学およびコンピュータツールを統合した学問：キットのマニュアルより抜粋）を体験しました。このキットでは、頬や毛髪の細胞からDNAを取り出し、PCR法にてPV92部位のAlu配列の遺伝子型を決定します。Alu配列はランダムに一般集団に挿入されているので、ある地域に住みついているヒト集団における遺伝子頻度を研究するのに有効です。
このキットの特筆すべき点は、実験で増幅する遺伝子配列

が、特定の病気や身体的特徴に関係が無く、生徒の精神面での配慮も行われていることだけではなく、ウェブ上のデータベース（http://www.bioservers.org/bioserver/）を利用して、クラス集団のAlu配列の遺伝子頻度について世界の生徒達が行った実験結果と比較することができるところです。このHP上からALLELE SERVER→Manage Groupsをクリックすることで、各国の実験結果を見ることが出来ます。1999年から主にアメリカのデータが載っており、今回の実験でもアメリカとの比較を主に行いました。残念ながら日本からの登録が少なく、本校がデータ登録するまで日本のデータは見当たりませんでした。比較する上でも、今後より多くの学校からの登録が望まれます。
以下は、アメリカにおけるAlu配列の遺伝子型の頻度と本校の実験結果との比較したものです。（表1）

表1

分類	遺伝子頻度（※アメリカ）	遺伝子頻度（本校SSCI）2005年2月	2005年12月
ホモ（＋／＋）	0.24	0.55	0.75
ヘテロ（＋／－）	0.55	0.45	0.19
ホモ（－／－）	0.21	0.00	0.06

※『PV92 PCR/Informatics』キットのマニュアル中の数値

実験結果よりホモ（－／－）において、アメリカの結果と大きく異なることが分かりました。また、アメリカ国内の地域毎の比較、アメリカ以外の国との比較においても日本と違いがあることが分かりました。
現段階では、高校一年生の統計や遺伝の知識は十分ではなく、このキットのポテンシャルを十分いかしきれていないのが現状です。しかし将来「遺伝子」の仕組みや生命現象を分析する上で、アルゴリズム等の数学の分野が必要となってくると考えます。今後は統計処理や集団遺伝学・遺伝統計学の学習等を、数学科と連携しプログラムに取り入れたいと考えています。

【生命倫理】

上記の一連の実験を行った後に、社会科教員と連携し『生命倫理』に関する二つの論点「遺伝子組換え技術の応用・是か非」「遺伝子情報のビジネス利用・是か非」を取り上げ、ディベートを行いました。

<論点「遺伝子組換え技術の応用・是か非」についての生徒への説明>
遺伝子組換え技術によって、病気（成長ホルモン不足、糖尿病のインシュリン）の治療などに応用されているが、組替えのガイドラインの内容や組替えた生物の危険性、食品の安全性に疑問を持つ声もある。ヒトへの応用も視野に入れて、その是非を考える。

ディベートを行った結果、生徒達は様々な視点から「遺伝子」について理解が深まったようです。立場が異なるもの同士での意見交換をすることで、科学を正しく伝えることの難しさも学んだようです。またディベートを行う前は、遺伝子組換え技術に「やや否定的」な立場だった生徒が、ディベート後に「やや肯定的」な立場に変わるなど、生徒の気持ちの変化もありました。ある事柄について、大まかな印象で肯定や否定をしていることに気づく生徒もいました。

【生徒のディベートの感想 抜粋】

ディベートは議論が難しかったけど、実際にやってみてすごく楽しかった。遺伝子組換えについて利点や問題点など知識が深まった。遺伝子を組換えたものに触れてみたいと思った。

【ディベート型授業の評価結果】（表2）
はい…4 3 2 1…いいえ の4段階で答える

表2

調査項目	4 はい	3	2	1 いいえ	肯定的評価 3+4（%）
この授業の内容が理解できましたか	58%	25%	17%	0%	83%
今回のテーマに関して興味・関心は高まりましたか。	75%	17%	8%	0%	92%
生命科学に関して興味・関心は高まりましたか。	83%	17%	0%	0%	100%
この授業を受けて良かったですか。	83%	17%	0%	0%	100%

ーおわりに

ディベート型授業の後に、日本生物教育学会の高校生ポスター発表の部にて、「遺伝子」の発表を行う予定です。この経験を通じて、幅広い知識を深めつつ、様々な意見を持つ大人や他の高校の生徒達と話し合うことの大切さ、他人の意見を受け入れることの重要性を感じてくれればと思います。
「遺伝子」の理解だけでなく、コミュニケーションによる問題解決能力の開発等も含むこのプログラムには、多くの課題が残されています。今回のこの報告をもとに、プログラムの問題点や日本の生物教育について皆様と一緒に考えていければと思います。

㈳北里研究所　メディカルセンター病院
研究部 バイオメディカル・ラボラトリー

Bridge

科長補佐　医学博士　小林　憲忠 先生

研究室の概要

当研究室は、社団法人北里研究所　北里研究所メディカルセンター病院研究部に属す。北里研究所の創立75周年を記念して、埼玉県北本市に北里研究所メディカルセンター病院が設立され、平成元年に開業した。当研究室も病院開設時にバイオメディカル棟として併設されたが、元々、東京都港区白金にあった北里研究所病院研究部バイオメディカル・ラボラトリーより暖簾分けしたものである。

北里研究所の創設者である北里柴三郎先生の教えである「叡智と実践」「予防医学への貢献」をモットーに基礎医学と臨床医学を結びつけるための研究の場として、1979年白金の地においてバイオメディカル・ラボラトリーが産声を上げた。開設当時の理念を受け継ぎ、当研究室では生体防御学の観点より、感染症・腫瘍・自己免疫疾患に関する研究を展開している。また、製薬会社より依頼のある新薬開発に伴う動物試験の受託や、抗菌・抗真菌・抗ウィルスなどの消毒剤等に関する受託試験ならびに空気清浄機を代表とする種々の環境改善機材の病原微生物を指標とした評価試験を行っている。最近では、機能性食品などの安全性試験および生体における効能に関して、動物と健常人ボランティア用いた基礎と臨床試験も行っている。

連絡先：〒364-8501　埼玉県北本市荒井6-100　北里研究所メディカルセンター病院　研究部バイオメディカル・ラボラトリー
TEL:048-593-1236　mailto:kobayashi-n@kitasato.or.jp

―現在の研究内容

現在精力的に行っている研究課題として「老齢個体における生体防御機能の解析：特にT細胞を中心とした機能解析」および「食品アレルギー治療のための食品アレルギーメカニズムの解析」がある。当研究部の特色を生かし、機能性食品や経口ワクチン等の開発に繋がる研究を展開している。

主要研究課題として以下の3つがあげられる。

1. **老齢個体における生体防御機構に関する研究**
2. **自己免疫疾患の発症メカニズムにおける分子生物学的研究**
3. **経口免疫寛容とアレルギー発症メカニズムに関する研究**

―研究におけるバイオ・ラッド製品

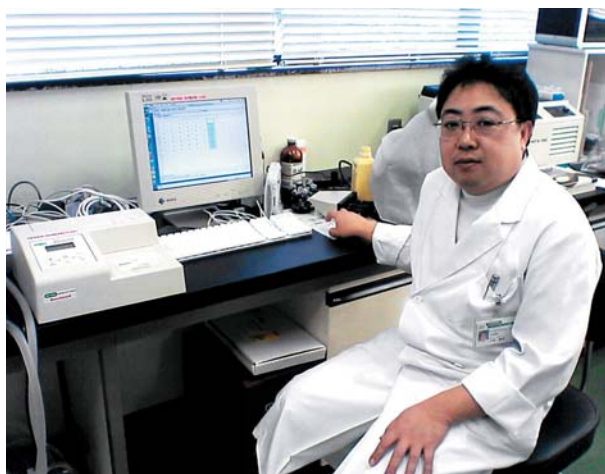
サイトカイン、シグナル伝達の研究をELISA法で解析している。測定にはBenchmarkプレートリーダーを活用している。使い勝手がよく、ソフト（マイクロプレートマネージャー）がMacintosh対応であるため重宝している。MacOSのバージョンアップにも丁寧に対応していただいた。また、タンパク質電気泳動の試薬は昔から信頼しているので、現在もタンパク質スタンダード、プレミックスバッファーなどを主に使用している。今後はシグナル伝達に関与する遺伝子発現の解析のため、定量PCRの導入も予定している。ラボのスペースを有効活用できる点から、筐体が非常にコンパクトであるMiniOpticonリアルタイムPCR解析システムに注目している。

―今後の展望、注目する分野

タンパク質間相互作用、レセプター＝リガンドの構造など、今後は構造生物学による生体機能解析がますます重要になってくると思われる。同じリガンドに結合するリガンド分子であっても、どのアミノ酸部位が結合するかによって、細胞内に伝わるシグナルが変化することは容易に想像できる。生体防御機構の解明には、これらのシグナルの変化と、タンパク質間相互作用の立体的な構造解析が必要だと考えている。

研究室としては「ワクチン開発」「予防医学」を柱とした研究を進めたい。

―バイオ・ラッドに期待すること

イノベーターによる最新実験手法は、インパクトが大きい反面、研究現場に広く浸透するまでの壁が大きい。バイオ・ラッドの製品は簡単、便利で低価格を売りに、新しい技術をより多くの研究者に広げているイメージがある。今後も、最新技術の汎用化と、多くの研究者がより気軽に導入できるような製品開発を期待している。

Benchmarkマイクロプレートリーダーを用いてELISAプレートの測定を行う小林先生

すべての研究者の方にリアルタイムPCRシステムを！

小さな巨人

ラボスペースを占有しないコンパクトサイズのMJ Miniサーマルサイクラーと
MiniOpticonリアルタイムPCR解析システム

MJ Miniサーマルサイクラーは、48ウェルタイプのコンパクトサイズでありながら、旧MJ Research社の技術を生かして高パフォーマンスです。MiniOpticonリアルタイムPCR解析システムは、MJ Miniサーマルサイクラーをベースとした2波長測定システムで、リアルタイムPCRとして最も小さいサイズのシステムのひとつです。

MJ Mini サーマルサイクラー

- ■最高のPCR効率と正確な定量性のための温度グラジェント機能
- ■優れた温度均一性
- ■軽量コンパクトサイズ

MiniOpticonリアルタイムPCR解析システム

MJ Miniの特長に加え

- ■励起にはLED、検出には高感度フォトダイオードを使用し、測定の際に可動しないデザイン

MJ Miniサーマルサイクラー（左）
－18×32×20cm：4.1kg

MiniOpticonリアルタイムPCR解析システム（右）
－18×32×33cm：6.8kg

詳細な情報は弊社Webサイトをご覧ください。http://discover.bio-rad.co.jp

Practice of the patented polymerase chain reaction (PCR) process requires a license. The MJ Mini thermal cycler and the MiniOpticon system include an Authorized Thermal Cycler, and may be used with PCR licenses available from Applied Biosystems. Their use with Authorized Reagents also provides a limited PCR license in accordance with the label rights accompanying such reagents. Some applications may also require licenses from other third parties.

Visit us on the Web at **discover.bio-rad.co.jp**
日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
ライフサイエンス事業本部　116-0014　東京都荒川区東日暮里5-7-18
TEL : 03-5811-6270　FAX : 03-5811-6272
Helping Science Serve Mankind

Technical Reports

siRNA法による遺伝子発現抑制効果の包括的評価

抑制効果判定はmRNA発現レベル？ それともタンパク発現レベル？

大阪市立大学大学院医学研究科整形外科学教室／野村-古渡　千澄

siRNAは、二本鎖RNAがその塩基配列と同じ塩基配列を持つmRNAの分解を惹起することで標的遺伝子の発現を抑制できる簡便な方法として現在広く知られている。しかしながらその一方で、なかなか効果的な塩基配列が特定できない、比較するコントロールの選択が難しいなど、効果的に遺伝子ノックダウンを行えるsiRNAにたどりつくまでに時間と労力と経費を費やすことも珍しいことではない。今回は筆者が実際にsiRNA実験を行った中で経験した、抑制効果をRNAレベルでは効果なしと判定されていたsiRNAがタンパクレベルで判定すると実際には機能していた例を中心に、siRNA実験の落とし穴について報告する。

背景

RNA interference（RNAi）は発現抑制したいmRNAと同じ完全長の塩基配列を持つ2本鎖RNAを線虫に導入すると、標的mRNAを分解することからgene silencing法として1998年に報告された。以来急速に研究が進み、哺乳類細胞においては、標的mRNAに存在する20～25塩基配列を選び2本鎖RNA（siRNA）として細胞内に導入するだけでgene silencingを行えることが明らかになった。この方法の発見により、遺伝子組換え動物を作出しなくても、培養細胞レベルでの遺伝子発現抑制を行い標的遺伝子の生物学的意義の検討することが可能となり、細胞生物学の分野ではsiRNA法はPCR法の再来の画期的な方法と絶賛された。

しかしながら、一見簡単そうに見えるこの方法もsiRNAの塩基配列をどこにするかによって抑制効果が得られる場合と得られない場合、すなわち“当り、はずれ”があり、実際に筆者も全長2.5 kbのmRNAに対して3箇所選び2箇所当る場合もあれば、10箇所以上試してようやく1箇所だけ当ったというケースも経験した。siRNAの受託合成会社も様々なsiRNA塩基配列検索プログラムを開発し、アルゴリズムも常に更新しているが、実際のところやはり導入して見るまで“当り、はずれ”については神のみぞ知るところのようである。

配列の選択については人智が及ばずとも、それ以外の実験はできる限り円滑に行いたいと考え、siRNAの抑制効果の判定にRT - PCRやリアルタイムRT-PCRを使ってmRNAの発現レベルで評価を行うのと、ウエスタンブロッティングでタンパクの発現量で評価を行うのとどちらが効率的なのか検討を行った。その結果抑制効果がmRNAレベルとタンパク質レベルが異なるケースを経験したので報告する。

mRNAはそのまま、タンパク質はノックダウン！

現在siRNAの導入方法にはプラスミドにsiRNA配列を組み込み細胞内で発現させる方法と二本鎖RNAの状態で細胞に導入する方法があるが、筆者らは後者の方法で行っている（図1）。

A

1日目：翌日30～50％ confluentとなるように細胞を12ウェルディッシュに培養

2日目：siRNA（40 nM）をリポフェクションにて導入

3日目：細胞を回収

リアルタイムRT-PCR
解析装置：iCycler iQ、MyiQ
増幅試薬：iQ SYBR Green Supermix

ウエスタンブロッティング
メンブレン：Sequi-Blot PVDF
検出装置：ChemiDoc XRS-J

B

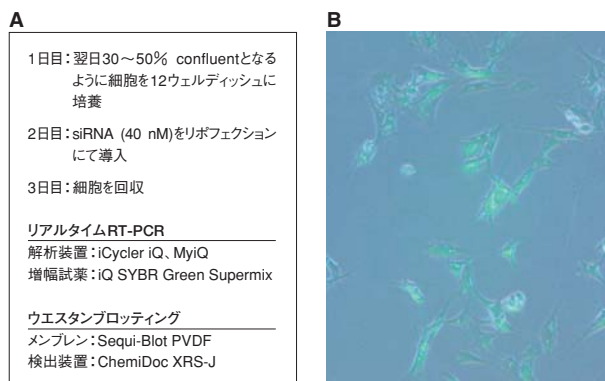



図1
（A）実験プロトコール、（B）マウス骨髄ストローマ細胞に蛍光標識コントロールsiRNAを導入した際の導入効率。90％以上の細胞に導入が認められる

リアルタイムRT-PCR
Fold of induction（0、0.5、1.0、1.5）
cont　A　B
siRNA（40nM）

ウェスタンブロッティング
siRNA（40nM）
標的遺伝子
β-アクチン

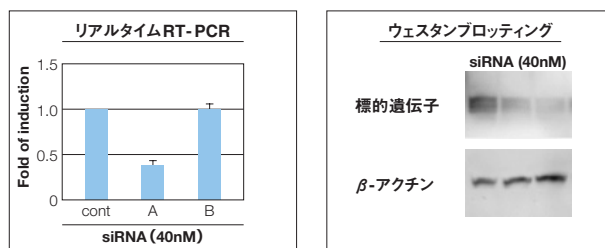



図2
リアルタイムRT-PCR、ウエスタンブロッティングによる抑制効果の判定

マウス骨髄ストローマ細胞に蛍光標識コントロールsiRNA（cont.）、遺伝子特異的siRNA（A、B）をそれぞれ導入した。

リアルタイムRT-PCRではAのみで発現抑制が認められたが、ウエスタンブロッティングを行うと、A、B両者とも抑制効果が認められた。

*標的遺伝子で複数のバンドが認められるのは、バリアントである。

図2に示したように、蛍光標識した陰性コントロールsiRNA、標的遺伝子に対するsiRNAとして“A”、“B”を導入した。リアルタイムRT-PCRでmRNAレベルを評価すると、“A”のみで発現抑制が認められた。しかしながら、ウエスタンブロッティングで評価すると、“A”、“B”ともに発現抑制が認められた。“A”はmRNAの発現レベルが下がっているのでタンパク質が消失するのは当然であるが、

“B”については、mRNAが分解されていないにも関わらず、タンパク質の発現抑制が認められたのである。

何が起こったのか?

siRNA“B”では何が起こったのか? 疑問に思いsiRNAに関する学術セミナーを聴きに行ったり文献を検索した結果、“siRNAと標的mRNAの塩基配列に一塩基のミスマッチが存在すると、RNAを分解することなくタンパク質の翻訳抑制がかかる”[1)2)]というヒントを得た。

筆者は、siRA合成を受託会社に依頼している。その際には受託会社のホームページのsiRNA配列検索サイトにアクセスし、Webに標的mRNAのシークエンスもしくはGenBankのAccession No.を入力すると、そのWebはGenBankにアクセスし、BLAST検索も行ったうえで、標的mRNAに特異的な塩基配列で、かつ現在報告されているsiRNAにとって必要条件をクリアした候補が表示される。その候補の中から“これぞ!”と思う配列をWeb上で選んで発注している。そのため塩基配列の入力ミスとは無縁のはずである。

もしや・・・と思い自分の使っている細胞の標的遺伝子の塩基配列を見直してみると、やはりsiRNA“B”の標的部位にGenBank登録配列にはない遺伝子多型(polymorphism)と思われる塩基置換が認められた。

抑制効果をmRNAレベルで評価する? タンパク質で評価する?

この現象を見たとき、RNAレベルでもタンパク質レベルでもノックダウンできればいいのだからと、はじめは単純にタンパク質で評価しようと考えた。しかし落ち着いて考えてみると筆者が現在行っているsiRNA実験は、抑制効果こそ樹立された培養細胞株で判定しているが、ゴールはin vivoでの使用である。GenBank登録配列にsiRNA“B”が効果を示すか否かまでは確認していないが、siRNA“B”は遺伝子型に依存して効果が現れる可能性が高い。もしsiRNA“B”の評価を培養細胞株のタンパク質のみで判定していたら、おそらく遺伝子多型には気づかなかったと思われる。気づかないままin vivo実験を行ってしまったら、メンデルの遺伝の法則に従いsiRNA“B”が良く効くマウス、少し効くマウス、全く効かないマウスの3群が現れてしまうだろう。

ではRNAレベルだけの評価では? と考えると、現在はリアルタイムPCR法により多検体を短時間で定量することが可能であるし、リアルタイム用のプライマー、プローブもヒトやマウスであれば自分でデザインしなくても手に入るため簡便で正確のように思える。抑制効果判定にタンパク質を用いれば“タンパク質が合成されないsiRNA”ということで筆者の実験のように“A”、“B”両方が当りで、この時の勝率は2勝2敗であったが、mRNAで評価を行った場合には“RNAが分解されるsiRNA”ということで一つ条件が厳しくなり勝率は1勝3敗と勝率が下がる(実験者にとってはストレスが増える)。また細胞内のmRNA量とタンパク質量が相関しないタンパク質も多く報告されており、RNAのみの評価に依存できるのはこのようなことがないと確実にわかってい遺伝子だけであると考えられる。

抑制効果を、良い抗体があって、培養細胞株のように遺伝的にはある程度均一なバックグラウンドをもつものにsiRNAを導入した実験を行うのであれば、タンパク質のみの評価でも構わないと思われるが、実験の目的によっては、siRNAの抑制効果判定はmRNAレベルとタンパク質レベルの両方の評価を一度は行ってみた方が無難なようである。

おまけの落とし穴

RNAウイルスが細胞に感染し細胞内で増殖を始めると、ウイルスゲノム複製のため細胞内に二本鎖RNAが合成される。この時、細胞は身を守るためPKR(double-stranded RNA-dependent protein kinase)を活性化する。活性化したPKRはeIF2α(eukaryotic initiation factor 2 alpha)をリン酸化し、これにより細胞内ではmRNAからのタンパク質の翻訳が抑制され、ウイルスにとって必要なタンパク質が合成されないようにしていると考えられている。siRNA導入時にも配列によりこのPKRが活性化することが報告されている。(図3)に示したのは、前述のsiRNA“A”、“B”の実験を行った際の培養ウェル中の総タンパク量を測定したデータである。この時に同じ条件で導入したsiRNA“C”では他のsiRNAと比べてタンパク量が極端に少ない。おそらくPKRの活性化によるものと考えられる。

PKRの活性化はウイルス感染時のみならず他の情報伝達経路によっても惹起される。筆者は骨芽細胞の実験をしているが、最近PKRが骨形成に重要との報告もされており[3)]、siRNAを使った実験でPKRが活性化した場合、siRNAによる発現抑制されたタンパク質の影響であるのか、PKRの影響であるのかわからなくなる危険性があることがわかった。

siRNA法自体は非常に手軽な方法ではあるが、やはり抑制効果の判定にはかなり慎重になった方がよいと考えられる。

図3
マウス骨髄ストローマ細胞にsiRNA を導入した際の1ウェル(12ウェルディッシュ)当りの総タンパク量

siRNA	cont	A	B	C
タンパク量(μM)	26.2 ± 0.3	21.6 ± 1.9	19.8 ± 0.4	11.7 ± 1.6

参考文献

1. Saxena S, Jonsson ZO, Dutta A. :Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. J Biol Chem. 2003 Nov 7;278(45):44312-9.
2. Du Q, Thonberg H, Wang J, Wahlestedt C, Liang Z. :A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. Nucleic Acids Res. 2005 Mar 21;33(5):1671-7.
3. Yoshida K, Okamura H, Amorim BR, Ozaki A, Tanaka H, Morimoto H, Haneji T. :Double-stranded RNA-dependent protein kinase is required for bone calcification in MC3T3-E1 cells in vitro. Exp Cell Res. 2005 Nov 15;311(1):117-25.

CLINICAL DIAGNOSTICS GROUP
診断薬事業本部　取り扱い製品のご紹介

自己免疫疾患検査関連

自己免疫検査において優れた解析機能搭載で世界の最先端を行く測定システムと各種体外診断用医薬品

PhD システム

- IFA＋ELISAを１つのシステムで自動化・省力化・省スペースを実現
- １台のPCで最大10台までのPhDワークステーションをネットワーク管理

EIA　軽量・省スペースなボディに多機能を搭載
大量・高速処理、高信頼性、簡単操作を実現するEIAアナライザー

IFA　抗核抗体(ANA)検査等で広く用いられている間接蛍光抗体法(IFA)基質スライド検査を希釈検体の調製からスライドへの検体分注／試薬分注・洗浄までを装置内で自動化

EVOLIS

卓越した技術をコンパクトに集約。先進の全自動マイクロプレートEIA装置EVOLIS。
EVOLISは、採血管からのサンプリングから、検体前希釈（試験管またはマイクロプレート）、ウェルへの検体分注、免疫反応試薬分注、プレート洗浄、酵素試薬・停止液の分注、測光、計算まで、EIA検査の全工程の完全自動化を実現。多彩な機能でラボにゆとりと安心をお届けします。

糖尿病マーカーHbA1c製品（Sysmex社販売）

グリコヘモグロビン分析装置　D-10システム

HPLC法を利用したHbA1c全自動分析装置。検体の希釈、分離操作、全血中に含まれるグリコヘモグロビンの算出、結果の打ち出しまでを一元的に行うことができます。

全血中ヘモグロビンA1c濃度測定装置 マイクロマットⅡ

アフィニティ法を利用した小型ヘモグロビンA1c濃度測定装置。カートリッジ式の試薬を用い簡便に5分で結果が得られます。

精度管理 コントロール

230種類を超えるコントロール製品の豊富な製品ラインナップで、臨床検査のほぼすべての領域の精度管理でお役に立ちます。
また、項目のマルチ化と測定方法・測定機種のマルチ化を図り、数百の項目、数千の測定方法をカバーし、検査室の多様な品質管理の効率的な運用に貢献します。

HIV検査薬

後天性免疫不全症（AIDS）の原因ウイルスであるヒト免疫不全症ウイルス（HIV）の感染を検査する試薬（体外診断用医薬品）を各種ラインナップしています。
凝集法の製品：「PA オート ジェネディア HIV-1/2」および「ジェネディア HIV-1/2 ミックスPA」については、製造委託及び独占販売契約に基づき富士レビオ株式会社が製造販売しています。

HIV抗体スクリーニング用試薬

- PA オート ジェネディア HIV-1/2　※日赤専用の輸血スクリーニング用試薬
- ジェネディア HIV-1/2 ミックスPA（輸出用製品名：SFD HIV-1/2 PA）
- ジェンスクリーン HIV Ag-Ab [写真]

HIV抗体確認用試薬

- ラブ ブロット1
- ラブ ブロット2
- ペプチラブ 1、2

バイオ・ラッド 診断薬事業本部はお客様の問題点や製品の技術などについてのお問合せに対応いたします。また安心してお使いいただける製品の供給に万全を期しているだけでなく、ご購入後のメンテナンスサービスも承っております。

ご遠慮なく下記よりお問い合わせください。

TEL 03-5811-6290　FAX 03-5811-6697

日本生物工学会

2005年11月15日（火）～17日（木）　つくば国際会議場

日本生物物理学会

2005年11月23日（水）～25日（金）　札幌コンベンションセンター

日本分子生物学会

概　要

2005年12月7日（水）～10日（土）の4日間、福岡ヤフードームおよびシーホークホテル他にて行われました。日本分子生物学会において、今年もバイオ・ラッドでは、展示ブースにおける製品の展示およびランチョンセミナーを開催いたしました。

今回セミナーでは、「定量PCRの最新解析技術　～RNAi ソリューションでの定量PCR～」と題しまして、RNAiソリューションの中でも、最も重要なアプリケーションのひとつである定量PCR（リアルタイムPCR）にフォーカスし、最新の発現解析方法やマルチプレックス定量PCRの有用性をご紹介いたしました。

私たちは、哺乳類のポリアミン生合成経路（細胞増殖のための重要な経路のひとつ）を研究するにおいて、遺伝子導入試薬siLentFect Lipid Reagentを用いて、siRNAをトランスフェクションしました。標的としては、ポリアミン生合成経路の中でも、重要な役割を担っているオルニチンカルボキシラーゼ（ODC）を選択しました。生合成経路におけるODCの発現量とそれに関連する他の遺伝子への効果をマルチプレックスRT-PCRにて確認しましたことをご紹介させていただきました。

展示ブースでは、RNAi研究関連製品（遺伝子導入→RNA調製→発現解析）と2次元電気泳動関連製品（タンパク質分離→電気泳動→イメージング）に分けて展示いたしました。新製品MiniOpticonは、リアルタイムPCR解析システムとしては、コンパクトボディであり通常のサーマルサイクラーとかわらないサイズであることから注目を集めていました。

日本免疫学会

概　要

2005年12月13日（火）～15日（木）の3日間、パシフィコ横浜にて行われました。日本免疫学会において、バイオ・ラッドでは、Bio-Plexサスペンションアレイシステムの展示およびランチョンセミナーを開催いたしました。

「免疫システムの全体像解明に向けた多数サイトカインの網羅的解析」と題し、セミナーでは、群馬県衛星環境研究所 調査研究グループ 木村博一先生、東北大学加齢研究所 遺伝子導入研究分野 中村晃先生をお招きしまして、両先生の最近の研究成果について発表していただきました。

展示ブースでは、マルチプレックスサスペンションアレイシステムBio-Plexサスペンションアレイシステムを展示いたしました。最近多くの論文等でも取り上げられ注目されているBio-Plexは、多くの来場者の興味を引いておりました。今後もこの分野に大きな期待が寄せられていくことを実感いたしました。
また直接、お客様から様々なお話を伺うことができましたこと深く御礼申し上げます。

バイオ・ラッドが出展、開催する展示、セミナーのご案内です。
詳細はウェブサイトのdiscover.bio-rad.co.jp、もしくは最寄りの営業所までお問い合せください。

展示会／セミナー			Exhibit Dates	Location
3月	【展示会】	第79回日本薬理学会年会 URL http://jps79.umin.jp/	2006年3月8日～10日	パシフィコ横浜
	【セミナー】	Proof of concept のための Bio-Plex を用いた臨床試験付随研究	2006年3月8日 12:00～13:00	パシフィコ横浜 5F C会場

展示会			Exhibit Dates	Location
5月	【展示会】	第5回国際バイオEXPO URL http://www.bio-expo.jp/	2006年5月17日～19日	東京ビッグサイト　東展示棟

展示会／セミナー			Exhibit Dates	Location
6月	【展示会】 【セミナー】	第20回国際生化学・分子生物学会議 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress URL http://www.congre.co.jp/iubmb/indexj.html	2006年6月18日～23日	国立京都国際会館 京都宝ヶ池プリンスホテル

ライフサイエンス総合カタログ2006/07まもなく完成です。

弊社もしくは販売代理店までご請求ください。

お客様の個人情報の取扱いに関して

当社は、Helping Science Serve Mankind（科学を通じて、社会に貢献する）を企業理念とし、この理念のもと「人類の更なる発展のため、お客様によりよいサービスを提供し続ける」ことを使命としています。

この使命を果たすために、当社はお客様の個人情報を適切に保護し、お客様やパートナー、そして社会の一層の信頼を得られるよう努めてまいります。
バイオ・ラッド製品、サービス、セミナー等へのお申し込み、展示会、学会などを通じて当社に登録していただいたお客様の個人情報は、当社からお客様へのご連絡、バイオ・ラッド製品、サービス、セミナーなどのご案内に利用させていただきます。ただし、お客様より情報を提供いただく際に利用目的を特定した場合は、その目的の範囲内で利用させていただきます。

個人情報管理についてのお問い合わせは右記のメールアドレスまでお願いします。 **HR_HP@bio-rad.com**

お客様の声をお聞かせください!

1　本号に登場した新製品についてお伺いいたします。当てはまるものに ☑印をつけてください

		すぐに購入したい	詳しく話を聞きたい	とりあえず資料送れ	興味なし
マイクロロトフォアセル	(p14)	□	□	□	□
モレキュラーイメージャーPharos FX	(p15)	□	□	□	□
Flamingo ゲルステイン	(p16)	□	□	□	□
電気泳動解析ソフトウェアPDQuest	(p17)	□	□	□	□
iQ Multiplex Powermix	(p18)	□	□	□	□
COS／HEKFectin	(p19)	□	□	□	□
Bio-Plex 200システム	(p20)	□	□	□	□

2　貴方自身はBioRadiationsに記事を投稿することに興味がありますか?(謝礼をご用意しています)

□ **ある**(具体的な内容は:　　　　　　　　　　　)

□ **製品の感想、ラボの紹介などなら掲載してもよい**(研究テーマ:　　　　　　　　　　　)

□ **バイオ・ラッド製品を用いた論文の別刷りを送付してもよい**
論文の詳細：雑誌名、出版年、ページ、タイトルなどをご記入ください
(　　　　　　　　　　　)

3　その他、本誌のなかで面白かったと思う記事をお書きください。(いくつでも)

Our Focus (p 2〜12) (　　　　　　　　　　　)
Product Focus (p22〜31) (　　　　　　　　　　　)
Cover Story (p32〜42) (　　　　　　　　　　　)
Bridge (p44〜48) (　　　　　　　　　　　)
Technical Reports (p50〜51) (　　　　　　　　　　　)

ご送付先(情報等ご送付の宛先となりますので、ご記入はお間違いのないようにお願いします)

(フリガナ)
ご氏名　　　　　　　　　　Email
ご所属
ご住所 〒□□□-□□□□
TEL　　　　　　　　　　FAX

上記は、お客様に有益と思われる情報を日本バイオ・ラッドからご提供するためにも使用いたします。

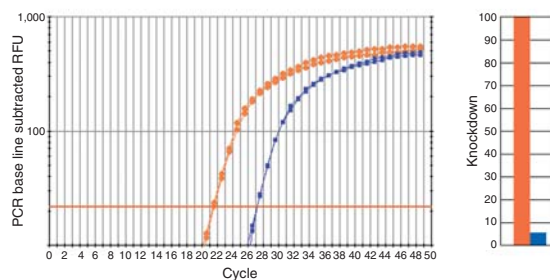
FAX Number 03-5811-6272

genetransfer

ほ乳動物細胞用siRNA導入試薬

siLentFect™ Lipid Reagent

遺伝子導入テクノロジーのリーダーであるバイオ･ラッドから、
siRNAデリバリーに適したsiLentFect Lipid Reagentをご紹介します。

- 優れたsiRNA導入効率
- 少量のsiRNAでの効果的なノックダウンが可能
- 試薬量も少なく、実験コストを軽減
- サイレンシング実験には重要な低い細胞毒性
- 幅広い細胞種での利用が可能

siRNAとsiLentFectを使用したGAPDH遺伝子のサイレンシング実験
6wellプレート中のHeLa細胞に10nM GAPDH siRNA（青■）または非特異的なコントロールsiRNA（オレンジ■）を2.5μlのsiLentFectにてトランスフェクトしました。細胞を48時間後に回収し、cDNAをテンプレートとして定量PCRを行ないました。ノックダウン率はコントロールを100%として示しています。

遺伝子導入のことならバイオ･ラッドにおまかせください。
siLentFectのほかにもリポフェクション試薬･エレクトロポレーション装置などを取り揃えています。

Visit us on the Web at **discover.bio-rad.co.jp**
日本バイオ･ラッド ラボラトリーズ株式会社
ライフサイエンス事業本部　116-0014　東京都荒川区東日暮里5-7-18
TEL : 03-5811-6270　FAX : 03-5811-6272
Helping Science Serve Mankind